

Aus der Orthopädischen Klinik und Poliklinik – Klinikum Großhadern

der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Direktor: Prof. Dr. med. Dipl. Ing. Volkmar Jansson

**Einfluss der hyperbaren Oxygenierung auf das
Proliferationsverhalten und das Genexpressionsmuster
humaner Chondrozyten**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Nadine Annabelle Höchsmann

aus Neuburg an der Donau

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

| | |
|---|--|
| Berichterstatter: | Prof. Dr. med. Peter E. Müller |
| Mitberichterstatter: | Priv. Doz. Dr. med. Oliver Pieske Priv. Doz. Dr. med. Marcus Schmitt-Sody |
| Mitbetreuung durch die promovierte Mitarbeiterin | Dr. med. Carolin Melcher |
| Dekan | Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR |
| Tag der mündlichen Prüfung | 19.12.2013 |

Für meine Mutter und Walter

| | |
|---|-----------|
| 1. Einleitung..... | 6 |
| 1.1 <i>Hyperbare Sauerstofftherapie</i> | 6 |
| 1.1.1 Definition und historischer Hintergrund..... | 6 |
| 1.1.2 Physikalische und physiologische Grundlagen..... | 7 |
| 1.1.3 Technische Voraussetzungen und Durchführung | 10 |
| 1.1.4 Anwendungsbereiche..... | 12 |
| 1.1.5 Risiken und Komplikationen der Therapie | 13 |
| 1.1.6 Die hyperbare Sauerstofftherapie als Gegenstand der Forschung | 14 |
| 1.2 <i>Hyaliner Gelenkknorpel</i> | 16 |
| 1.2.1 Allgemeines | 16 |
| 1.2.2 Entwicklung..... | 16 |
| 1.2.3 Anatomische Grundlagen | 17 |
| 1.2.4 Stoffwechsel | 21 |
| 1.2.5 Der Einfluss mechanischer Belastung auf Chondrozyten..... | 22 |
| 1.2.6 Knorpelschädigung | 23 |
| 1.2.7 Therapieansätze bei Knorpeldefekten..... | 24 |
| 2. Fragestellung | 26 |
| 3. Material und Methoden..... | 27 |
| 3.1 <i>Methoden</i> | 27 |
| 3.1.1 Zellkultur | 27 |
| 3.1.2 Hyperbare Oxygenierung | 30 |
| 3.1.3 Proliferationsassay..... | 34 |
| 3.1.4 Molekularbiologie | 35 |
| 3.1.5 Statistik | 39 |
| 3.2 <i>Materialien</i> | 41 |
| 3.2.1 Verbrauchsmaterialien..... | 41 |
| 3.2.2. Geräte | 42 |
| 3.2.3 Chemikalien und Reagenzien | 42 |
| 3.2.4 Fertigkombinationen von Biochemikalien..... | 43 |
| 3.2.5 Software..... | 44 |
| 3.2.6 Zellkulturen | 44 |
| 3.2.7 Kulturmedien | 44 |
| 3.2.8 Primer | 45 |
| 4. Ergebnisse..... | 47 |
| 4.1 <i>Kultivierung humaner Chondrozyten und Fibroblasten</i> | 47 |

| | |
|---|------------|
| 4.2 Etablieren der Hyperbaren Oxygenierung | 49 |
| 4.3 Proliferationsassays | 49 |
| 4.3.1 Erstellung von Standardkurven zur Ermittlung der absoluten Zellzahlen | 49 |
| 4.3.2 Vorversuche: Proliferation humaner Fibroblasten | 50 |
| 4.3.3 Proliferation humaner Chondrozyten nach Hyperbarer Oxygenierung (TS 300/90) | 53 |
| 4.3.4 Der Einfluss der Druckhöhe auf die Proliferation humaner Chondrozyten | 54 |
| 4.3.5 Der Einfluss der Behandlungsdauer auf die Proliferation humaner Chondrozyten | 56 |
| 4.4 Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen | 57 |
| 4.4.1 Einfluss der Hyperbaren Oxygenierung auf die Expression von Chondrozytenmarkern | 57 |
| 4.4.2 Einfluss der hyperbaren Oxygenierung auf die Synthese von Apoptosemarkern bei humanen Chondrozyten | 67 |
| 5. Diskussion | 75 |
| 5.1. Kultivierung humaner Chondrozyten | 75 |
| 5.2 Hyperbare Oxygenierung von Zellkulturen | 77 |
| 5.3 Proliferation von Fibroblasten und Chondrozyten unter Hyperbarer Sauerstofftherapie | 78 |
| 5.4 Geninduktion durch hyperbare Sauerstofftherapie | 81 |
| 5.5 Eignen sich humane Chondrozyten als Zielzellen für die Hyperbare Sauerstofftherapie? | 85 |
| 6. Zusammenfassung | 87 |
| 7. Literaturverzeichnis | 89 |
| 8. Abbildungsverzeichnis | 98 |
| 9. Abkürzungsverzeichnis | 101 |
| 10. Danksagung | 103 |

1. Einleitung

1.1 Hyperbare Sauerstofftherapie

1.1.1 Definition und historischer Hintergrund

Die hyperbare Oxygenierung (HBO) stellt eine medizinische Therapieform dar, bei der Patienten für definierte Zeiträume und Intervalle systemisch Sauerstoff (O_2) unter höheren Umgebungsdrücken als 1013 hPa zugeführt wird [103]. Dies geschieht durch Inspiration von in der Regel 100% Sauerstoff, wofür spezielle Druckkammern benötigt werden. Eine lokale Applikation von Sauerstoff, oder das Inspirieren von reinem Sauerstoff unter atmosphärischem Druck erfüllen die Definitionskriterien folglich nicht [28]. Synonym zur hyperbaren Oxygenierung werden die Begriffe Hyperbare Sauerstofftherapie, HBO-Therapie, oder im englischen Sprachgebrauch hyperbaric oxygen therapy, verwendet.

Der Brite Henshaw setzte im Jahre 1662 erstmals eine Druckkammer für medizinische Zwecke ein [17]. Er nutze hohe Luftdrücke zur Behandlung akuter Krankheiten und niedrige Drücke bei chronischen Erkrankungen. Im Laufe des 19. Jahrhunderts fanden Überdruckkammern eine weite Verbreitung und deren heilende Wirkungen wurde ausführlich propagiert.

Erst ein Jahrhundert nach Entdeckung des Sauerstoffes (1771 durch Carl Wilhelm Scheele und 1774 durch Joseph Priestley) führte der französische Physiologe Paul Bert erste Versuche unter Überdruckbedingungen durch [17]. Im Laufe der Jahrhunderte konnten immer mehr Erkenntnisse über die Hyperbare Oxygenierung gewonnen werden, wobei vor allem die britische und amerikanische Marine während des Zweiten Weltkrieges auf diesem Gebiet forschte [57]. 1960 konnten die Chirurgen Boerema und Brummelkamp am Tiermodell zeigen, dass es durch den Einsatz der hyperbaren Oxygenierung gelingen kann, den physikalisch gelösten O_2 -Anteil im Blut so stark zu erhöhen, dass ein Organismus gänzlich ohne Hämoglobin als Sauerstoffträger auskommen kann [7]. Zur gleichen Zeit wurde von den Engländern Smith und Sharp erstmalig erfolgreich eine Kohlenmonoxidvergiftung durch Sauerstoff unter Überdruck therapiert [28, 57].

1.1.2 Physikalische und physiologische Grundlagen

Mehrere physikalische und physiologische Prinzipien sind Grundlage der Entstehung und Anwendung der hyperbaren Sauerstofftherapie [28, 103].

- Die Druck-Volumen-Beziehung von Gasen wird durch das Gesetz von **Boyle-Mariotte** beschrieben, welches besagt, dass das Produkt aus Druck (p) und Volumen (V) konstant ist:

$$p \cdot V = \text{konst.}$$

Dies bedeutet, dass sich das Volumen eines Gases (z.B. O₂ oder auch CO₂) unter erhöhtem Druck verringert, wobei seine Dichte zunimmt. Umgekehrt kommt es bei abnehmendem Druck zu einer Vergrößerung des Gasvolumens. Dieses Prinzip wird beispielsweise bei der Therapie einer Gasembolie durch hyperbare Oxygenierung genutzt.

- **Dalton** postulierte, dass zur Berechnung des Gesamtdruckes eines Gasgemisches (p_{ges}) die Einzelgase entsprechend ihres Volumenanteils berücksichtigt werden müssen. Der Gesamtdruck stellt die Summe der Einzeldrücke dar:

$$p_{\text{ges}} = p_1 + p_2 + \dots + p_x$$

Der Partialdruck eines Gases (p_x) entspricht somit dem Produkt aus dem Gesamtdruck des Gasgemisches (p_{ges}) und der Fraktion (bzw. des Volumenanteils) dieses Gases (F_x)

$$p_x = F_x \cdot p_{\text{ges}}$$

- Des Weiteren ist das Gesetz von **Henry** von grundlegender Bedeutung für die HBO-Therapie. Dieses besagt, dass das in einem Medium physikalisch gelöste Gasvolumen (c) sich proportional zum Partialdruck (p) des Gases verhält, wobei der Löslichkeitskoeffizient (α) mit einzubeziehen ist.

$$c = p \cdot \alpha$$

Unter Bedingungen, die einer Partialdruckverdoppelung entsprechen, verdoppelt sich so beispielsweise die in Blut und Geweben gelöste Gasmenge. Umgekehrt wird durch die Reduktion des Überdruckes die entsprechende Gasmenge wieder frei.

- Sauerstoff wird als Teil des Inspirationsgases alveolär aufgenommen und anschließend zum einen an das Transportvehikel Hämoglobin gebunden und zum anderen physikalisch im Blut gelöst. Unter physiologischen Bedingungen ist der chemisch an Hämoglobin gebundene Teil deutlich größer als der Gelöste und entspricht in etwa 200 ml O₂ pro Liter Blut.

Der Sauerstoffgehalt des arteriellen Blutes (CaO₂) ist also von verschiedenen Variablen abhängig, die in der folgenden Formel zum Ausdruck kommen:

$$\text{CaO}_2 = (1,39 * \text{Hb} * \text{SO}_2) + (0,0031 * \text{pO}_2)$$

(1,39: Hüfner'sche Zahl; Hb: Hämoglobingehalt; SO₂: Sauerstoffsättigung; pO₂: Sauerstoffpartialdruck; 0,0031: Löslichkeitskoeffizient von O₂)

Die Hüfner'sche Zahl beschreibt hierbei die Sauerstoffbindungskapazität von Hämoglobin, d.h. 1 g Hämoglobin bindet *in vivo* maximal 1,39 ml Sauerstoff.

Die Inspiration von reinem Sauerstoff alleine erhöht die Menge an physikalisch gelöstem O₂ bereits auf das Siebenfache (0,3 ml O₂/dl unter Umgebungsdruck bei Atmung von Raumluft; 2,1 ml O₂/dl bei Atmung von 100 % O₂). Erhöht man zusätzlich den Umgebungsdruck, so lässt sich der physikalisch gelöste Sauerstoffgehalt noch erheblich steigern (z.B. bis auf 6,8 mlO₂/dl bei 3 bar Überdruck) [76]. Der Anteil an chemisch gebundenem Sauerstoff kann durch diese Maßnahmen jedoch nicht maßgeblich beeinflusst werden. Ein wesentliches therapeutisches Prinzip der hyperbaren Sauerstofftherapie besteht somit darin, den Anteil an physikalisch gelöstem Sauerstoff drastisch zu erhöhen, um das Sauerstoffangebot für die Gewebe des Körpers zu potenzieren.

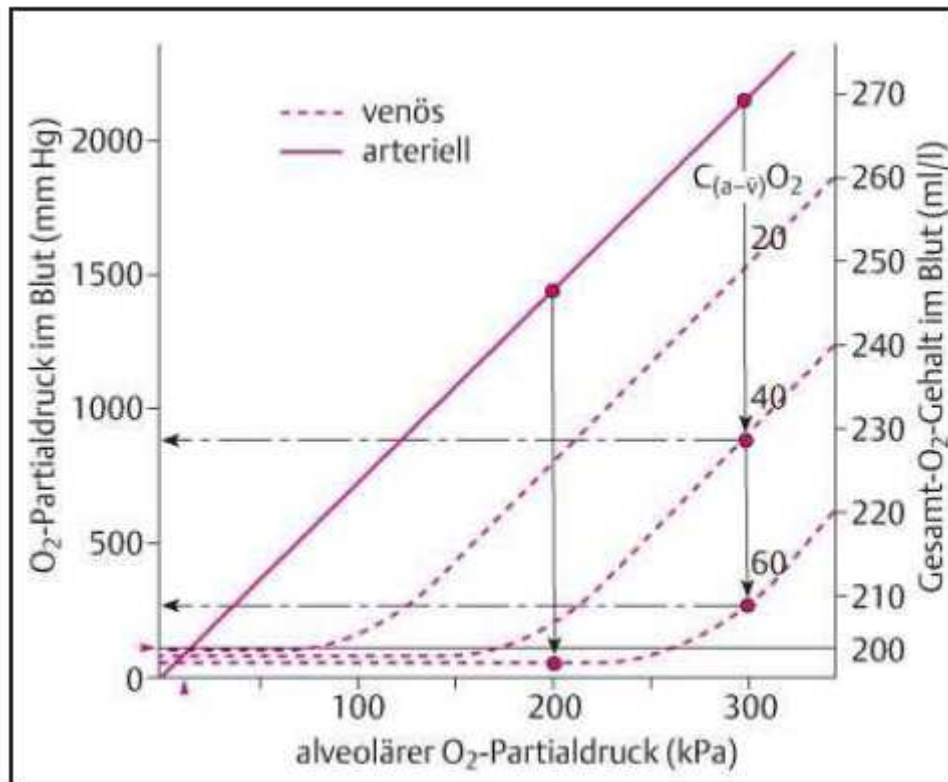


Abb. 1: Einfluss unterschiedlich hoher alveolärer Sauerstoff-Partialdrücke auf den arteriellen Sauerstoffpartialdruck bzw. Sauerstoffgehalt und das Verhalten des venösen Sauerstoffpartialdrucks in Abhängigkeit von der arteriovenösen Sauerstoffdifferenz C(a-v)O₂ (nach Bock et al. 1994; in Kochs, Adams, Spies: Anästhesiologie, ISBN 9783131148629 [57])

- Des Weiteren kann man anhand der **Fickschen Diffusionsgleichung** einen anderen Aspekt des postulierten Wirkprinzips der HBO-Therapie erklären [28, 76]:

$$d_s/d_t = K \cdot A \cdot c_1 - c_2/d$$

(d_s/d_t = Diffusionsrate; K = Diffusionskonstante; A = Austauschfläche; $c_1 - c_2$ = Konzentrationsdifferenz; d = Schichtdicke)

Durch die hyperbare Sauerstofftherapie wird die Konzentrationsdifferenz von Sauerstoff zwischen Blut und Gewebe erhöht, was bei ansonsten konstanten Bedingungen zu einer Erhöhung der Diffusionsrate führt. Auch eine Vergrößerung der Diffusionsstrecke kann durch diesen Mechanismus kompensiert werden, was in mangeldurchblutetem Gewebe oder bei erhöhtem Diffusionswiderstand therapeutisch von Nutzen sein kann.

1.1.3 Technische Voraussetzungen und Durchführung

Die hyperbare Sauerstofftherapie wird in speziell angefertigten Druckkammern durchgeführt [47, 76]. Man unterscheidet dabei Einpersonen- und Mehrpersonenkammern. Letztere werden vorwiegend in Deutschland und Europa eingesetzt [103] und haben den Vorteil, dass mehrere Patienten gleichzeitig behandelt werden können und medizinisches Personal bei Bedarf in der Kammer anwesend sein kann (z.B. zur Betreuung von Intensivpatienten in kritischem Zustand).



Abb. 2: Mehrpersonendruckkammer, HBO Zentrum München, www.hbozentrum.de

Der Druckaufbau erfolgt mit Atmosphärenluft, während die Patienten reinen Sauerstoff über eine dicht sitzende Maske, einen Endotrachealtubus oder ein Kopfzelt inspirieren. Die Behandlung in Einpersonenkammern ist vor allem in den USA weit verbreitet. Hier erfolgt der Druckaufbau mit 100% Sauerstoff [94], den der Patient während der

Behandlung frei einatmet. Der Vorteil der besseren Mobilität der Kammer steht den Nachteilen der eingeschränkten Zugriffsmöglichkeit und möglicherweise erhöhten Sicherheitsrisiken gegenüber.

Die Behandlungsdauer, der applizierte Druck sowie die Gesamtzahl der Behandlungen variieren je nach Indikationsstellung und folgen standardisierten Protokollen. Die am häufigsten angewendeten Therapieschemata sind das US Navy Treatment Table 6 Schema (TS 280/60), das Boerema Schema (TS 300/90) und das Problemwundenschema (TS 240/90). Die Kurzbezeichnungen für die Therapieschemata (TS) setzen sich dabei aus dem applizierten **Druck** in kPa (z.B. TS **280/60**) und der Behandlungsdauer in Minuten (z.B. 280/**60**) zusammen. Der verwendete Druck entspricht hierbei der Summe aus Atmosphärendruck (1 bar;

entspricht ca. 100 kPa) und zusätzlichem hydrostatischen Druck (in der Regel 1 bis 2 bar) [94].

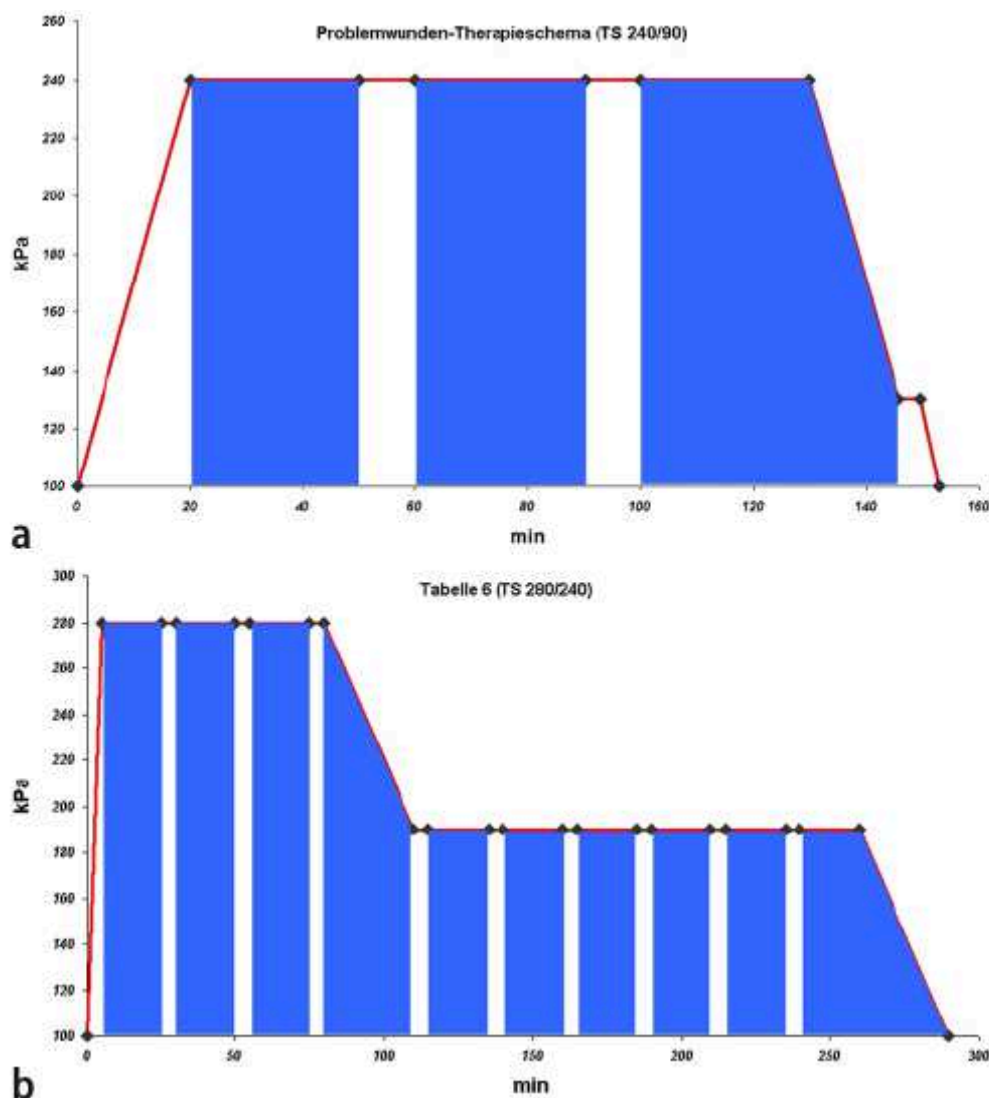


Abb. 3: Beispiele für typische Behandlungsschemata; Blau hinterlegt: Phasen von Inspiration von 100% Sauerstoff; a) Problemwundenschema; b) modifizierte TT6 zur Behandlung des Tauchunfalls; (aus: Wiese S, Hyperbare Sauerstofftherapie [103])

Eine Therapiesitzung in der Druckkammer wird in drei Phasen unterteilt:

- Kompressionsphase (kontinuierlich langsamer Druckaufbau)
- Isopressionsphase (Aufrechterhalten des gewünschten Druckniveaus für die vorgesehene Behandlungszeit)
- Dekompressionsphase (kontinuierlich langsames Absinken des Kammerdruckes bis zum Erreichen des Umgebungsdruckes)

Während der Isopressionsphasen erfolgen in der klinischen Anwendung intermittierende kurze Phasen, bei denen nur Druckluft eingeatmet wird. Dies soll mögliche sauerstofftoxische Effekte verringern [18].

1.1.4 Anwendungsbereiche

1976 formierte sich in den USA die Undersea and Hyperbaric Medical Society (UHMS), ein internationaler Fachausschuss für die Überdruckmedizin, welche in regelmäßigen Abständen eine Auflistung von Krankheitsbildern publiziert, bei denen sich die Behandlung mittels HBO-Therapie als nützlich erwiesen hat (siehe Abb. 4) und deren deutsches Pendant die Gesellschaft für Tauch- und Überdruckmedizin (GTÜM) darstellt. Kritiker sehen die HBO jedoch weiterhin eher als eine „Behandlungsform, die ständig auf der Suche nach neuen Indikationen ist“ [31] und

| Committee Report der Undersea and Hyperbaric Medical Society | |
|--|---|
| Anerkannte Indikationen (Jain [9]) | |
| 1. | Luft- oder Gasembolie |
| 2. | CO-Vergiftung |
| | CO-Vergiftung, wenn durch Zyanidvergiftung verkompliziert |
| 3. | Clostridiale Myositis und Myonekrose |
| 4. | „Crush-Verletzung“, Kompartmentsyndrom und posttraumatisches Reperfusionssyndrom |
| 5. | Dekompressionserkrankung |
| 6. | Behandlung von Problemwunden |
| 7. | Außergewöhnlicher Blutverlust (Anämie) |
| 8. | Intrakranieller Abzess |
| 9. | Nekrotisierende Weichteilgewebsinfektionen (Myonekrosen, nekrotisierende Fasciitis, nekrotisierende Zellulitis) |
| 10. | Osteomyelitis (therapierefraktär) |
| 11. | Spätschaden nach Strahlentherapie (Weichteil oder Knochennekrose) |
| 12. | Kritische Hautgrafts und Myokutanlappen |
| 13. | Verbrennungen |
| CO Kohlenstoffmonoxid | |

Abb. 4: Indikationen zur Hyperbaren Oxygenierung nach UHMS (aus: Wiese S, Hyperbare Sauerstofftherapie [103])

stellen deren Nutzen insgesamt in Frage.

Hauptindikation der hyperbaren Sauerstofftherapie ist weiterhin die Dekompressionskrankheit (Caisson Krankheit). Diese entsteht meist durch zu rasches Auftauchen aus großer Tiefe, wobei Stickstoff in Form von Gasbläschen in der Blutbahn und den Geweben ausperlt und Symptome wie Pruritus,

Osteoarthralgien, oder Parästhesien auslösen kann. Auch zur Behandlung arterieller Luftembolien wird hyperbarer Sauerstoff erfolgreich eingesetzt, wobei die Wirksamkeit bei beiden Krankheitsbildern durch die physikalischen Gesetze von Henry, Dalton und Boyle-Mariotte erklärt werden kann.

Bei anderen Erkrankungen, wie z.B. Kohlenmonoxidvergiftungen oder Anaerobierinfektionen macht man sich die durch hyperbare Oxygenierung erzeugte hohe Sauerstoffanreicherung im Gewebe zu Nutze [67, 69].

Zudem gilt die HBO-Therapie bei Knochentransplantationen, Multipler Sklerose oder Tinnitus als viel versprechender Therapieansatz, wobei der wissenschaftliche Nutzen weiterhin unbelegt bleibt.

Als absolute Kontraindikation [27, 49] für die hyperbare Sauerstofftherapie gilt ein unbehandelter Pneumothorax, während schwere chronisch obstruktive Lungenerkrankungen, Epilepsie, Schwangerschaft oder Klaustrophobie als relative Kontraindikationen angesehen werden und einer äußerst strengen Indikationsstellung bedürfen.

1.1.5 Risiken und Komplikationen der Therapie

Wie jede andere medizinische Therapieform birgt auch die hyperbare Oxygenierung spezifische Risiken und unerwünschte Nebeneffekte [28, 49, 80, 103, 103]. Die am häufigsten beobachteten Komplikationen während der Kompressionsphase sind Barotraumen, welche durch die Druckunterschiede zwischen der Umgebung und den luftgefüllten Hohlräumen des Körpers entstehen. Während der Isopressionsphase stehen direkte sauerstofftoxische Effekte im Vordergrund, die vor allem das ZNS und die Lunge betreffen [76]. Vor allem bei langer Behandlungsdauer auf hohen Druckniveaus besteht die Gefahr der Entwicklung von zerebralen Krampfanfällen, welche meist in Form von Grand Mal Anfällen auftreten. Diesen können Prodromi wie Schweißausbrüche, Tachykardie, Benommenheit, oder Übelkeit vorausgehen. Kardiopulmonale Symptome wie Hustenreiz, Dyspnoe, oder retrosternale Schmerzen können auf eine Tracheobronchitis oder ein ARDS (acute respiratory distress syndrome) hinweisen. Zudem besteht vor allem bei Patienten mit obstruktiver Lungenerkrankung während der Dekompressionsphase das Risiko einen Pneumothorax oder ein Lungenemphysem zu entwickeln, weshalb stets auf einen

langsamen Druckauf- und -abbau geachtet werden muss. Während der Dekompression kann zudem eine durch ein hohes intrapulmonales Gasvolumen ausgelöste Kreislaufdepression auftreten, da der venöse Rückstrom zum Herzen behindert wird. So ist eine adäquate Überwachung der Patienten während der Therapie unerlässlich, um bei Komplikationen umgehend intervenieren zu können.

1.1.6 Die hyperbare Sauerstofftherapie als Gegenstand der Forschung

Die Wirksamkeit der Hyperbaren Oxygenierung wurde sowohl in *in vivo*, als auch in *in vitro* Studien untersucht. Zwar konnten *in vivo* positive Effekte auf bestimmte Krankheitsbilder gezeigt werden, diese bleiben jedoch bisher in der relativ überschaubaren Anzahl an *in vitro* Studien auf zellulärer Ebene unbestätigt. Tompach und Mitarbeiter untersuchten zunächst den Effekt der hyperbaren Oxygenierung auf Zellen, die an Wundheilungsprozessen beteiligt sind. Die Ergebnisse ihrer *in vitro* Studie zeigten, dass die HBO-Therapie die Proliferation von Endothelzellen und Fibroblasten abhängig von der Behandlungszeit stimulieren kann [97]. Dimitrijevic [21] und Mitarbeiter testeten die Reaktion von Hautzellen (Fibroblasten, Melanozyten und Keratinozyten) auf die hyperbare Oxygenierung und beobachteten ebenfalls einen stimulierenden Effekt auf die Proliferation von Fibroblasten in Abhängigkeit von der Höhe des applizierten Druckes. Auch Kang et al. [58] sowie Kunnavatana et al. [60] konnten in ihren *in vitro* Studien positive Effekte auf die Proliferation von Fibroblasten und die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren erkennen. Honda und Mitarbeiter [48] hingegen beschrieben einen negativen Effekt auf das Zellwachstum von Fibroblasten unter hyperbarer Sauerstofftherapie und führten dies auf eine erhöhte Sauerstofftoxizität unter HBO zurück.

Nach Endothelzellen und Fibroblasten wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen im Folgenden auch Stammzellen mit hyperbarem Sauerstoff behandelt. Milovanova et al. [68] zeigten beispielsweise eine Stimulation der Vaskulogenese unter HBO-Therapie. Thom und Mitarbeiter [95] schlossen aus ihren Studien, dass die hyperbare Oxygenierung über einen Stickstoffmonoxid-abhängigen Weg Knochenmarksstammzellen mobilisieren kann.

In neueren Studien von Yuan et al. [31, 110] und Chan et al. [15] wurde die Wirkung der hyperbaren Sauerstofftherapie auf Gewebe des Bewegungsapparates untersucht: Yuan und Mitarbeiter konnten in einer *in vitro* Studie ein verbessertes

Zellwachstum von Chondrozyten unter hyperbarer Oxygenierung verifizieren [109] und am Tiermodell durch die Behandlung mit hyperbarem Sauerstoff die Defektheilung in Knorpelgewebe beschleunigen [110]. Chen et al. konnten – ebenso wie Yuan et al. - durch den Einsatz von hyperbarem Sauerstoff im Tiermodell eine verbesserte Heilung von osteochondralen Defekten im Kniegelenk beobachten [16]. Diese vielversprechenden Forschungsergebnisse machen die hyperbare Sauerstofftherapie zu einem interessanten Therapiekonzept für die orthopädische Chirurgie.

In Anbetracht der wenigen, teils widersprüchlichen Ergebnisse, sowie der unter anderem von Speit und Mitarbeitern [91] und Rothfuss und Mitarbeitern [84, 85] beschriebenen schädigenden Auswirkungen im Sinne von Gewebe- und Zellschäden, muss deren Einsatz jedoch kritisch hinterfragt werden.

1.2. Hyaliner Gelenkknorpel

1.2.1 Allgemeines

Hyaliner Knorpel zählt zu den Bindegeweben des menschlichen Körpers und ist vor allem in Gelenken, aber auch in den oberen Atemwegen (Nasenseptum, Trachea, Bronchien) und im Primordialskelett zu finden. Als Bestandteil des Gelenks ist er ein wichtiges Instrumente der Bewegungsgestaltung und für die Integrität des menschlichen Körpers von entscheidender Bedeutung. Hyaliner Knorpel überdeckt die gelenkbildenden Flächen diarthrotischer (d.h. mit einem Gelenkspalt versehenen) Gelenke und ist einem komplexen Zusammenspiel aus physikalischen Kräften, wie Kompression, Scherkräften und hydrostatischem Druck ausgesetzt [24, 72]. Obwohl er nur wenige Millimeter dick ist, weist er eine extreme Druckeleastizität und Zugfestigkeit auf und erfüllt so vor allem reibungsverringernde, lastabsorbierende und lastverteilende Aufgaben und minimiert die Krafteinwirkung auf den subchondralen Knochen [9, 10, 41]. So ermöglicht der hyaline Knorpel einen schmerz- und nahezu reibungsfreien Bewegungsablauf in Gelenken.

1.2.2 Entwicklung

Ursprung der Knorpelentwicklung stellt die mesenchymale Stammzelle dar [34, 61, 62]. Mesenchymale Stammzellen (MSC) sind multipotente Zellen, die vor allem im Knochenmark, aber auch in anderen Geweben, wie z.B. Knochen oder Blut zu finden sind. MSC exprimieren keine spezifischen Marker, durch die sie identifiziert werden können. Sie werden vielmehr darüber definiert, dass sie in Zellkultur an glatten Oberflächen adhären sind, einen CD 74, 90 und 105 positiven, aber CD 45, 14 und 19 negativen Phänotyp aufweisen und sich hauptsächlich osteogen, chondrozytär und adipozytär differenzieren [3, 63, 79]. Zudem können auch Myozyten, Tenozyten und neuronale Zellen aus ihnen hervorgehen [3, 107]. Mesenchymale Stammzellen lagern sich zusammen und differenzieren sich unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren wie TGF- β zu Chondroprogenitor-Zellen. Aus diesen Vorläuferzellen entstehen durch weitere Differenzierung Chondroblasten und folglich

die Chondrozyten. Kennzeichnend hierfür ist die Expression spezifischer Marker [61], wie Aggrecan oder Kollagen Typ II und die Veränderung der Zellmorphologie.

1.2.3 Anatomische Grundlagen

Hyaliner Gelenkknorpel ist ein avaskuläres, alymphatisches und aneurales Gewebe. Wie für Bindegewebe typisch, besteht Knorpelgewebe aus Zellen, Wasser (70-80 % des Gesamtvolumens [9]) und einer extrazellulären Matrix, die Fasern und amorphe Grundsubstanz enthält und 20-30% der Knorpelmasse ausmacht. Das hyaline Knorpelgewebe ist nur dünn mit Chondrozyten, den einzigen zellulären Bestandteilen besiedelt (ca. 1-2 % des Gesamtgewebes [9, 64]). Diese synthetisieren die extrazelluläre Matrix, welche sich aus Gewebeflüssigkeit und Makromolekülen wie Kollagen [25, 32] (vor allem dem knorpelspezifischen Kollagen Typ II, aber auch Typ IX, XI, XXVII), Proteoglycanen (v.a. Aggrecan), sowie Biglycan, Decorin, Fibromodulin und COMP (cartilage oligomeric matrix protein) [35, 44] zusammensetzt. Dank dem fein ausgewogenen Zusammenspiel der Matrixkomponenten ist hyaliner Knorpel trotz seiner festen Konsistenz durch Druck (begrenzt) verformbar und kehrt nach Entlastung in seine ursprüngliche Form zurück. Diese Eigenschaft wird als Druckelastizität bezeichnet.

Schon in der Organisation des Gelenkknorpels wird die Basis für seine hohe Funktionalität geschaffen. Diesbezüglich werden vier oberflächenparallele Zonen mit unterschiedlichen Eigenschaften beschrieben [9, 34, 35, 81, 99] (vgl. Abb. 5): die oberflächliche Tangential Zone (Zone I), die mittlere Übergangs- (Zone II), die tiefe Radiär- (Zone III) und die kalzifizierende Knorpelzone (Zone IV). Unterschiede zwischen den Zonen finden sich vor allem bezüglich der Orientierung und Anordnung der Kollagenfibrillen, sowie hinsichtlich der Form und Anordnung und Syntheseleistung der Chondrozyten.

- Die *oberflächliche* (tangential) Zone nimmt 10-20% der Knorpeldicke ein. Die Chondrozyten dieser Zone erscheinen abgeflacht, zeigen eine diskoide, spindelförmige Morphologie und sind parallel zur Knorpeloberfläche angeordnet. Diese Chondrozyten besitzen ein gut ausgebildetes RER (raues endoplasmatisches Retikulum) und reichlich Mitochondrien, aber einen

kleinen Golgi-Apparat und wenige Glykogenspeicher. Verglichen mit Chondrozyten der anderen Schichten synthetisieren sie viel Kollagen und wenig Proteoglycan [9], (v.a. der Aggrecangehalt ist hier sehr gering). Dekorin und Biglykan sind demgegenüber in dieser Schicht am höchsten konzentriert. Die Chondrozyten dieser Zone werden von einem gut ausgebildeten Maschenwerk aus relativ dünnen, tangential angeordneten, parallel zur Oberfläche verlaufenden Kollagenfibrillen umgeben [9, 34, 99, 106]. Diesem Kollagennetzwerk hat die tangential Zone die innerhalb der vier Zonen am besten entwickelte Zugfestigkeit zu verdanken, durch deren Hilfe sie besonders geeignet ist, den während der Gelenkbewegung einwirkenden Zug-, Scher- und Druckkräften standzuhalten [9, 99]. Mit ihrem hohen Wasseranteil von bis zu 80% und ihrer geringen Permeabilität [9] hat diese Zone zudem große Bedeutung für die Kontrolle des Flüssigkeitsaustausches.

- Die (*mittlere*) Transitorialzone gilt als Übergang von der Tangentialzone in die Radiärzone. Sie ist die dickste der vier Zonen (40-60% der Knorpeldicke) und stellt das typische Bild des hyalinen Gelenkknorpels dar [9]. Die Chondrozyten in dieser Zone sind in kleinen Gruppen mit uneinheitlicher Längsausrichtung und schrägem Verlauf angeordnet und erscheinen mehr sphärisch und abgerundet [9, 34]. Sie besitzen ein gut ausgeprägtes RER, einen großen Golgi-Apparat und viele Mitochondrien. Die Zahl der Vakuolen und Vesikel ist gering, allerdings speichern sie größere Mengen an Fett und Glykogen. Der Kollagengehalt ist insgesamt geringer als in der oberflächlichen Zone, wobei die Kollagenfibrillen einen größeren Durchmesser haben und ein weniger geordnetes Netzwerk ohne bestimmte Orientierung bilden. Der Proteoglycangehalt (v.a. Aggrecan) ist hier deutlich höher [9, 34], wohingegen der Wassergehalt erniedrigt ist. Die Matrixzusammensetzung in dieser Zone weist deshalb eine verminderte Widerstandsfähigkeit gegenüber Zug-, Druck- und Scherkräften auf, während sie Druckkräften besser standhält.
- Die *tiefe* (radiale) Zone umfasst 30% der Knorpeldicke. Sie ist gekennzeichnet durch ihre sphärischen, in Säulenform senkrecht zur Oberfläche ausgerichteten Chondrozyten [9, 34]. Die Zelldichte ist in dieser Zone am geringsten, dafür weisen die Chondrozyten hier einen ausgeprägten Gehalt an RER, Mitochondrien, Golgi-Apparat und Glykogen auf. Die Kollagenfibrillen zeigen in dieser Schicht einen radiären Verlauf senkrecht zur Oberfläche.

Obwohl der Kollagengehalt dieser Zone vergleichsweise gering ausgeprägt ist, weisen die einzelnen Fibrillen den größten Durchmesser im gesamten Knorpel auf. Die radiale Zone stellt die Zone mit dem größten Proteoglycangehalt dar. Während der Kollagengehalt der Matrix mit steigendem Abstand von der Knorpeloberfläche abnimmt und somit vor allem in den oberflächlichen Anteilen eine Zugfestigkeit bedingt ist, wird in den tiefen Anteilen bedingt durch einen hohen Proteoglycangehalt vor allem eine große Drucksteifigkeit gewährleistet.

Die tiefe Zone wird nach unten durch die sog. „Tidemark“, die ehemalige Wachstumsfuge, begrenzt. Sie stellt die Grenze zwischen nicht kalzifiziertem und kalzifiziertem Knorpel dar.

- Als Grenzschicht zum subchondralen Knochengewebe findet sich direkt unterhalb der Tidemark eine dünne (3-9% der Knorpeldicke) kalzifizierende Knorpelschicht [9, 34]. Aufgrund der exponierten Lage direkt oberhalb des subchondralen Knochengewebes besitzt diese mineralisierte Zone eine Puffer-Funktion mit mittlerer mechanischer Festigkeit. In dieser Zone finden sich relativ kleine, runde, hypertrophe Chondrozyten, die in unkalzifizierten Lakunen liegen. Sie weisen eine relativ geringe metabolische Aktivität auf und besitzen dementsprechend wenig RER und Golgi- Apparat. Sie synthetisieren Kollagen Typ X und verfügen über Möglichkeiten der Induktion einer Mineralisierung der extrazellulären Matrix.

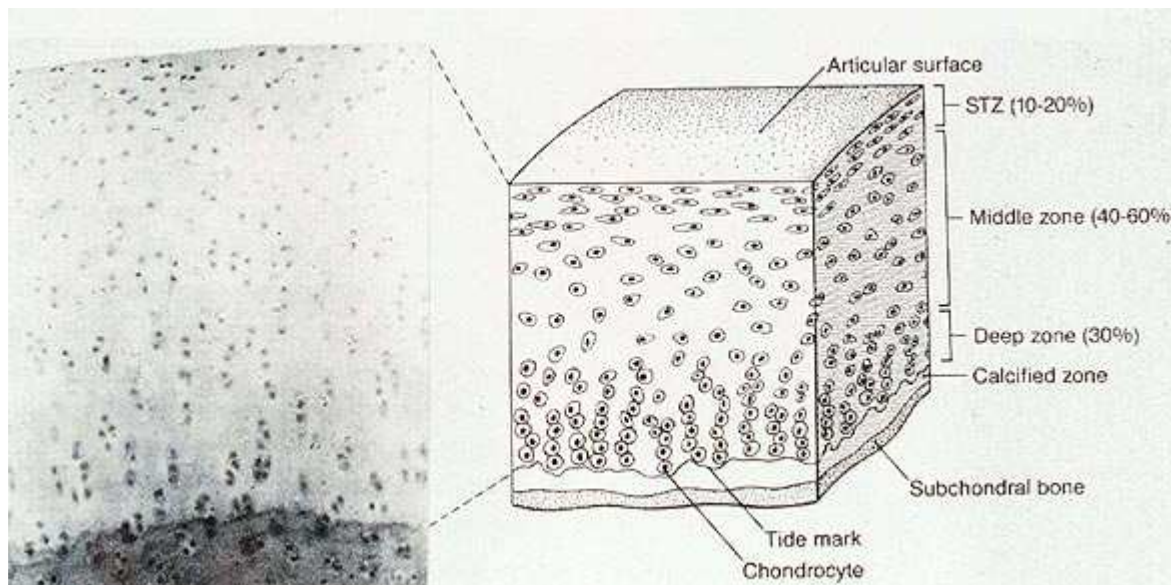


Abb. 5: Histologischer Aufbau von Knorpelgewebe: oberflächliche Zone (STZ), mittlere Zone (middle zone), tiefe Zone (deep zone) (aus: Nehrer S, Knorpelschäden im Knie [73])

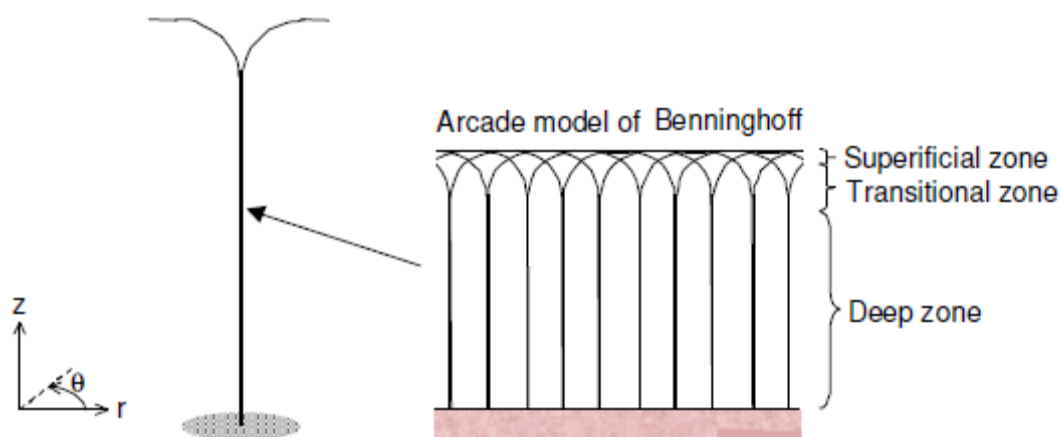


Abb. 6: Arkadenstruktur der Knorpelfasern des hyalinen Gelenkknorpels nach BENNINGHOFF aus [104]

Für die Stabilität und Widerstandsfähigkeit des Gelenkknorpels gegenüber Druck-, Zug- und Scherkräften ist die bereits 1925 von Benninghoff beschriebene Arkadenstruktur der kollagenen Fasern von besonderer Bedeutung (siehe Abb. 6). Sie zeigt sich in einer Verankerung der kollagenen Fasern in der unterhalb der Tide Mark gelegenen kalzifizierenden Zone, einer senkrecht zur Oberfläche verlaufenden

Ausrichtung der Fasern in den beiden mittleren Zonen, sowie einer arkadenförmigen Anordnung des Faserverlaufs in der oberflächlich gelegenen Tangentialzone.

1.2.4 Stoffwechsel

Knorpel ist ein avaskuläres Gewebe, das via Diffusion über die Synovialflüssigkeit mit Sauerstoff, Glucose und anderen Nährstoffen versorgt wird [9]. Da die Synovialflüssigkeit unter physiologischen Bedingungen einen niedrigen Sauerstoffpartialdruck [78] (pO_2 ca. 7%) aufweist, sind Chondrozyten stets einem hypoxischen Milieu ausgesetzt. Zudem findet sich im Knorpelgewebe ein von außen nach innen abnehmender Sauerstoffgradient [78] (oberflächlicher Bereich: pO_2 6-10%, knochennaher Bereich: $pO_2 < 1\%$). Bei Gelenkserkrankungen, wie z.B. der Arthrose oder der rheumatoiden Arthritis verringert sich der Sauerstoffpartialdruck im Gelenk noch weiter [37, 78]. So verbrauchen Chondrozyten verglichen mit gut vaskularisiertem Gewebe wie der Leber oder der Nieren zum einen nur einen viel geringeren Anteil an Sauerstoff, zum anderen sind sie in der Lage, bei schlechter Sauerstoffversorgung ihre metabolische Aktivität zu drosseln und auf anaerobe Wege der Energiegewinnung auszuweichen [9]. Eine Schlüsselrolle für den Stoffwechsel unter hypoxischen Umweltbedingungen hat der von den betroffenen Chondrozyten exprimierte „hypoxia inducible factor 1“ (HIF-1) inne, der die Expression bestimmter Gene, die für metabolische Prozesse bedeutend sind, zu regulieren scheint [64, 78].

Chondrozyten sind nicht nur adaptiert an hypoxische Bedingungen, sie können auch plötzliche und breite Schwankungen des vorherrschenden Sauerstoffpartialdruckes tolerieren [64]. So sind diese Zellen z.B. bei autologen Chondrozytentransplantationen einem Wechsel zwischen Hypoxie im Ursprungsgewebe und Hyperoxie unter Kulturbedingungen ausgesetzt. Trotz dieser Toleranz kann Hyperoxie, bzw. die dadurch verursachte Vermehrung an freien Sauerstoffradikalen (ROS = reactive oxygen species), den zellulären Stoffwechsel stören, was durch eine gesteigerte Laktatproduktion und eine Ausschöpfung der ATP-Reserven gekennzeichnet ist. Um sich vor Protein-, Lipid-, oder DNA-Schädigungen durch ROS zu schützen, besitzen die Chondrozyten Schutzmechanismen gegen oxidativen Stress [64].

Welchen Einfluss das Sauerstoffangebot auf Chondrozyten hat, konnte durch bisherige Forschungsergebnisse nur bedingt sichergestellt werden. Zudem sind die publizierten Aussagen widersprüchlich [64]. Trotz der Tatsache, dass Sauerstoff grundlegend für die Vitalität der Chondrozyten wichtig ist, bleibt offen, wie die Proliferation, (De-) Differenzierung und Morphologie durch ein hohes Sauerstoffangebot beeinflusst wird. Insbesondere im Bereich des Tissue Engineerings könnten weitere Erkenntnisse auf diesem Gebiet viel versprechende Therapieoptionen mit sich bringen.

1.2.5 Der Einfluss mechanischer Belastung auf Chondrozyten

Knorpelgewebe erfüllt aufgrund seiner biomechanischen Eigenschaften reibungsverringende, lastabsorbierende und lastverteilende Aufgaben, da es mechanischen Stimuli wie Kompression, Scherung und hydrostatischem Druck ausgesetzt ist [23, 72]. Schon unter Ruhebedingungen herrschen in der Umgebung des Gelenkknorpels durch osmotisch wirksame Kräfte hydrostatische Drücke von bis zu 2 bar [98]. Unter Belastung kann das Gewebe sogar Drücken von bis zu 10 MPa standhalten [24, 72, 98]. Dass die mechanische Belastung nicht nur von den Chondrozyten toleriert wird, sondern sogar auf deren Stoffwechsel und Synthese einwirkt, zeigten bereits Anfang der 1980er Jahre mehrere *in vivo* Versuche (Review von Urban J [98]). So konnte an immobilisierten Hasen beobachtet werden, dass die Synthese von Proteoglycan reduziert wird, wenn das Knorpelgewebe keiner mechanischen Stimulation unterliegt. In aktuellen Studien konnte gezeigt werden, dass mechanische Belastung die metabolische Aktivität [40], Proliferation und Syntheseleistung der Chondrozyten [72], sowie die Zusammensetzung der Extrazellulären Matrix beeinflussen kann [24, 72]. Eine Vielzahl von Studien konnte zudem belegen, dass durch Applikation von dynamischem hydrostatischen Druck bei Chondrozyten *in vitro* die Proteoglycan-, Aggrecan-, und Kollagen Typ II Synthese von Chondrozyten gesteigert werden kann [24].

1.2.6 Knorpelschädigung

Schon seit mehreren Jahrhunderten ist bekannt, dass Schäden am Gelenkknorpel, die im Zuge von Gelenkserkrankungen entstehen, nicht oder nur bedingt spontan heilen [4, 29, 52, 54]. Gelenksschäden gehen mit Schmerzen und Funktionseinschränkung einher. Hinsichtlich der Pathogenese von Gelenkerkrankungen [8] lassen sich vorwiegend mechanische und biologische Faktoren unterscheiden, jedoch müssen auch endogen genetische (z.B. Akromegalie, Morbus Paget, Hämophilie), metabolische (Hämochromatose) und entzündliche Ursachen bedacht werden. Ferner prädisponieren Fehlstellungen, rheumatische Erkrankungen, einseitige Belastung, weibliches Geschlecht, sowie zunehmendes Alter und Übergewicht.

Da es sich, wie bereits oben beschrieben beim hyalinen Gelenkknorpel um ein bradytrophes, avaskuläres und aneurales Gewebe handelt, ist im Falle einer Schädigung des adulten Gelenkknorpels mit einer irreversiblen Zerstörung des betroffenen Bereiches zu rechnen. Die Schäden am Gelenkknorpel werden dabei in chondrale und osteochondrale Defekte unterteilt. Osteochondrale Defekte reichen im Vergleich zu chondralen, nur den Knorpel betreffenden Defekten weitaus tiefer und beziehen den subchondralen, vaskularisierten Knochen mit ein. Ist der unterhalb der Grenzlamelle gelegene subchondrale Knochen in den Schaden mit einbezogen, kommt es zur Eröffnung subchondraler Blutgefäße. Durch die Einwanderung mesenchymaler Zellen aus Blut und Knochenmark und die Ausschüttung von Wachstumshormonen können subchondrale Läsionen hingegen bedingt repariert werden [4, 8, 30, 54] [64]. So entsteht anstelle des Defektes eine Art Reparatur-, oder Narbengewebe aus mechanisch minderwertigem Faserknorpel, der im Gegensatz zu hyalinem Knorpel hauptsächlich aus Kollagen Typ I besteht. Zusätzlich ist der Gehalt an Proteoglycan vermindert und die für den Gelenkknorpel typische Architektur kann nicht mehr erkannt werden. Darüber hinaus erfolgt keine Verankerung dieser Ersatzknorpelstrukturen mit dem umgebenden Gewebe. Das Reparaturgewebe ist zudem weniger widerstandsfähig gegen von außen einwirkenden Kräfte und neigt deshalb verglichen zu hyalinem Knorpel zu baldigem Verschleiß und Wiederauftreten von Beschwerden.

1.2.7 Therapieansätze bei Knorpeldefekten

Die Therapie von Knorpeldefekten stellt für die orthopädische Chirurgie eine große Herausforderung dar. Ältere Behandlungsformen, wie Lavage und Debridement der betroffenen Areale, konnten nur eine symptomatische Wirkung ohne langfristigen Nutzen erbringen [29, 53], während durch die Entwicklung von knochenmarkstimulierenden Techniken (Mikrofrakturierung, Pridie-Bohrungen) das Outcome der Therapie von Knorpeldefekten bereits verbessert werden konnte. Diesen arthroskopisch durchführbaren Techniken liegt die Idee zu Grunde, eine Verbindung zwischen dem Defekt und dem darunterliegenden, vaskularisierten Gewebe zu schaffen [55, 71, 92]. Durch die primäre Einblutung sollen Stammzellen mobilisiert werden, deren chondrogene Differenzierung im Folgenden eine Regeneration des Knorpelgewebes herbeiführen soll. Zur Behandlung kleiner Läsionen bis zu 2 bis 3 cm² haben sich diese Verfahren als durchaus geeignet erwiesen [29], größere Defekte müssen jedoch durch eine Osteochondraltransplantation (auch „Mosaikplastik“ oder „OATS“ genannt) versorgt werden [4, 6, 29, 53]. Hierbei werden aus wenig belasteten Gelenksarealen Knorpel-Knochen-Zylinder entnommen und in den Defektbereich übertragen. Zwischen den implantierten Gewebszylindern bildet sich Faserknorpel, sodass das behandelte Areal insgesamt aus Mischknorpel besteht.

Einen viel versprechenden Therapieansatz in der regenerativen Medizin stellt zudem die (konventionelle oder matrixgekoppelte) autologe Chondrozytentransplantation (ACT) dar [4, 29, 53, 56]. Hierbei werden arthroskopisch Knorpelzellen entnommen, *in vitro* kultiviert und anschließend in den chondralen Defekt implantiert, was eine Defektheilung mit hyalinem Knorpel zur Folge haben soll. Der Einsatz von geeigneten Trägermaterialien (Scaffolds) als Matrix scheint hierbei von bedeutendem Vorteil für die Integration und die biomechanischen Eigenschaften des Transplantates zu sein [2, 4]. Der Nachweis des erwarteten Langzeitnutzens des Verfahrens, sowie die Optimierung der Scaffolds ist ebenso Gegenstand aktueller Studien, wie der Einsatz von Adjuvantien (z.B. mechanische Stimulation, Wachstumsfaktoren etc.) zur Optimierung der ACT.

Zusätzlich stehen mesenchymale Stammzellen durch ihre Fähigkeit zur chondrogenen und osteogenen Differenzierung als alternative Quelle zur Reparatur chondraler Defekte im Fokus der Wissenschaft [3, 61, 74, 87]. Ob durch ihren

Einsatz die Entwicklung von histologisch und mechanisch suffizientem Knorpelgewebe gelingen kann, gilt es herauszufinden [3, 61].

2. Fragestellung

Verschiedene Forschungsgruppen [21, 60, 97] konnten *in vitro* bereits positive Effekte der hyperbaren Oxygenierung auf die Proliferation von Fibroblasten *in vitro* feststellen.

Die Sensibilität der Chondrozyten auf Druckbelastung [22, 24, 98] einerseits sowie auf Sauerstoff andererseits macht auch diese Zellen zu einem interessanten Forschungsziel für die Hyperbare Sauerstofftherapie. Aktuelle Forschungsergebnisse geben bereits erste Hinweise auf positive Effekte der HBO-Therapie auf Knorpelgewebe. Yuan und Mitarbeiter schlossen aus ihren tierexperimentellen Studien, dass die hyperbare Oxygenierung die Reparatur von Knorpeldefekten verbessern kann [109, 110]. Ebenso konnten Chen et al. am Tiermodell durch den Einsatz von HBO eine effektivere Heilung von osteochondralen Defekten erkennen. Es wurde jedoch bisher noch kaum untersucht, wie sich die hyperbare Sauerstofftherapie *in vitro* auf humane Chondrozyten, die bekanntlich *in vivo* an hypoxische Bedingungen adaptiert sind, auswirkt.

Die vorliegende Arbeit soll folgende Fragen klären:

- Welchen Einfluss hat die Hyperbare Sauerstofftherapie auf das Proliferationsverhalten von humanen Chondrozyten *in vitro*?
- Beeinflusst die Hyperbare Sauerstofftherapie das Genexpressionsmuster humaner Chondrozyten?
- Kann die Hyperbare Sauerstofftherapie als adjuvante Therapieoption zur Behandlung chondraler Defekte eingesetzt werden?

3. Material und Methoden

3.1. Methoden

3.1.1 Zellkultur

3.1.1.1 Allgemeine Anmerkungen

Um ein möglichst steriles Umfeld für den Umgang mit vitalem humanen Zellmaterial zu gewährleisten, wurden alle Arbeiten im Bereich der Zellkultur unter einer Laborwerkbank durchgeführt.

Alle verwendeten Nährmedien und Zusätze für die Zellkultur wurden, soweit nicht anders angegeben, vor Gebrauch in einem Wasserbad auf eine Temperatur von 37° C erwärmt und sofern nicht anders aufgeführt, wurden die Zellsuspensionen bei Raumtemperatur und 1500 Umdrehungen pro Minute für 5 Minuten zentrifugiert.

Außerhalb der Behandlungszeiten wurden alle Zellkulturen in einem Brutschrank bei 37° C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Als Versuchszellen wurden industriell isolierte humane Fibroblasten und Chondrozyten (von der Firma Provitro, Berlin bezogen), sowie aus Spendergewebe isolierte, primäre humane Chondrozyten verwendet. Letztere wurden im Institut für Rechtsmedizin der Ludwig-Maximilian-Universität München aus hyalinem Gelenkknorpel der Kniegelenkskondylen einer 65-jährigen verstorbenen kaukasischen Spenderin entnommen. Ein entsprechender Ethikantrag des Instituts für Rechtsmedizin hierfür liegt vor.

3.1.1.2 Isolation humaner Chondrozyten

Die Isolation der Chondrozyten erfolgte in modifizierter Technik nach einer von Shakibaei und Mitarbeitern beschriebenen Methode [89], welche im Labor für Biomechanik der LMU München bereits etabliert ist [66]. Das unter sterilen

Bedingungen entnommene, makroskopisch unauffällige Knorpelgewebe (hyaliner Gelenkknorpel aus dem Kniegelenk) wurde in ein Falconröhrchen mit Transportmedium (3-fache Konzentration an Penicillin/Streptomycin) überführt und bei + 4° C zwischengelagert. Nach der Behandlung mit Waschmedium wurde das Material in ca. 1 mm große, gleichmäßige Stücke geschnitten, wobei darauf geachtet wurde, knorpelfremdes Gewebe zu entfernen. Nach zweimaligem Waschen mit Waschmedium wurden die Gewebestücke gleichmäßig auf Petrischalen verteilt. Es folgte die einstündige Inkubation im Brutschrank bei 37 ° C unter Zusatz von 20 ml Pronaselösung (10 ml Waschmedium versetzt mit 10 ml Pronase 1 %). Anschließend wurde zweimal mit PBS gewaschen, bevor 20 ml 1 %ige Collagenaselösung (10 ml Waschmedium versetzt mit 10 ml Collagenase 0,2 %) hinzugefügt wurde. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 3 Stunden bei 37° C wurden die verbliebenen Gewebestücke mittels eines Falconsiebes der Porengröße 100 µm vom Überstand getrennt. Nach Zentrifugation wurde das entstandene Zellpellet in Nährmedium resuspendiert und anschließend die Zellzahl (siehe Punkt 3.1.1.4) und -morphologie mittels Mikroskopie bestimmt. Es folgte das Ausplattieren der Zellen in Triple-Flaschen (1 x 10⁵ Zellen pro Boden). Nach einer Ruhephase von zwei Tagen wurde erneut die Morphologie und Konfluenz bestimmt.

3.1.1.3 Kultivieren der Zellen

Die Chondrozyten und Fibroblasten wurden bis zu einer gewünschten Konfluenz von ca. 70 – 80 % kultiviert, wobei ein Medienwechsel alle 2 bis 3 Tage erfolgte. Dazu wurde das verbrauchte Nährmedium entfernt und nach einmaligem Waschen mit PBS durch frisches Medium ersetzt. Sobald die oben erwähnte Konfluenzrate erreicht wurde, wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurde zunächst das Kulturmedium ohne Rückstände aus den Flaschen entfernt. Im Folgenden wurde zu den Zellen eine Trypsin/EDTA (Ethylendiamintetraacetat)-Mischung gegeben, die sowohl die Anheftung der Zellen am Untergrund, als auch die Interzellularkontakte enzymatisch löst. Die Zellen wurden für fünf bis maximal zehn Minuten bei 37° C inkubiert, bis sie sich unter lichtmikroskopischer Kontrolle nicht mehr als adhärenter Zellverband, sondern als kugelige, schwimmende Einzelzellen darstellten. Die

enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von (im Kulturmedium enthaltenen) Proteinase-Inhibitoren gestoppt.

3.1.1.4 Ermittlung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe der Neubauer Zählkammer. Hierzu wurde eine bekannte Menge Zellsuspension (z.B. 10 µl) im Verhältnis 1:1 mit Trypanlösung vermischt. 10 µl des Gemisches wurden auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Unter dem Lichtmikroskop wurden daraufhin die vier Quadrate des Haemozytometers ausgezählt und die Zellzahl nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl (pro ml)} = n/4 * VF * 10^4$$

n = Anzahl gezählter Zellen in 4 Quadraten

VF = Verdünnungsfaktor = 2

Trypanblau kann die Zellmembran vitaler Zellen nicht passieren, weshalb eine Unterscheidung zwischen vitalen und nicht vitalen Zellen möglich ist. Erstere erscheinen als helle leuchtende Kugeln, tote Zellen dagegen färben sich blau an.

3.1.1.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Asservieren der Kulturzellen wurden diese in Einfriermedium, welches DMSO zu Vermeidung von Kristallisationen enthält, gelöst und kryokonserviert. Zur kurzfristigen Lagerung wurden Zellen bei – 80° C, zur Längerfristigen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Um diese Zellen erneut in Kultur zu nehmen, wurde sie in einem Wasserbad bei 37° C angetaut. Sobald sich das Zellmaterial aus dem Kryogefäß lösen ließ, wurde es in ein mit Medium gefülltes Zentrifugenröhrchen überführt und zu einem Pellet

abzentrifugiert. Nach Bestimmung der Zellzahl konnten sie bei einer Dichte von 1×10^5 auf entsprechend viele Kulturflaschen (175 cm^2) ausplattiert werden.

3.1.2 Hyperbare Oxygenierung

3.1.2.1 Aufbau und Eigenschaften der Druckkammer

Alle Druckversuche wurden mit der Geräte-Testkammer „HAUX-Testcom 200/2“ (Fabriknummer 200611), die von der Firma HAUX Life Support in Karlsbad hergestellt wurde, durchgeführt.



Abb. 7 HAUX TESTCOM 200/2; a) Sauerstoffeinlassventil, b) Sauerstoffauslassventil, c) Öffnungsschutzhebel, d) Sicherheitsventil, e) Druckabnehmer

Die Kammer wurde unserem Labor freundlicherweise vom Hyperbaren Sauerstoffzentrum München GmbH zur Verfügung gestellt und ist für Experimente mit Versuchsmaterialien bzw. Versuchstieren bis zu einem Überdruck von 2,0 bar bei sauerstoffgefüllter Kammer zugelassen. Sie fasst ein Volumen von 9,5 Liter bei einem Innendurchmesser von 200 mm und einer Innenlänge von 300 mm. Die Testcom 200/2 ist mit einem Manometer zur Anzeige des aktuellen Kammerdruckes

ausgerüstet und besitzt zudem ein Sicherheitsventil, das bei einem Ansprechdruck von 2,2 bar das Überschreiten des zulässigen Betriebsüberdrucks von 2,0 bar verhindert. Zum Öffnen der Kammer ist ein Öffnungsschutzhebel zu betätigen, der mit einem Entlüftungsventil versehen ist, sodass der Deckel der Kammer nur bei druckloser Kammer geöffnet werden kann. Die Sauerstoffzufuhr wird über ein Einlassventil gewährleistet, das über einen Schlauch mit Druckminderer und Schnellkupplung mit einer Sauerstoffflasche verbunden ist. Der Druckabbau erfolgt über ein Sauerstoffauslassventil.

Die durch den Hersteller angegebenen Sicherheitsbestimmungen wurden stets beachtet und es wurde exakt nach der Betriebsanleitung des Gerätes gehandelt.

3.1.2.2 Versuchsdesign

Um die Effekte der hyperbaren Oxygenierung untersuchen zu können, wurden die behandelten Zellen mit einer unbehandelten Kontrollgruppe verglichen, welche zu den Versuchszeiten bei Raumluft und –temperatur unter einer sterilen Werkbank aufbewahrt wurde.

Eine Anzahl von 5×10^5 Zellen wurde am Tag vor Beginn der Druckversuche abgezählt, nach zweimaligem Waschen mit PBS in RLT-Puffer lysiert und bei -80°C als Referenzwert für spätere Genanalysen kryokonserviert. Die übrigen Zellen wurden wie im folgenden Gliederungspunkt beschrieben in Petrischalen und 96-well-Platten ausgesät. Sechs Stunden nach dem Ausplattieren der Zellen wurde von jeder Zellreihe jeweils ein erster WST-1-Assay durchgeführt, um einen Ausgangs-, respektive Nullwert für die Proliferationsassays zu generieren.

Für sieben aufeinander folgende Tage wurden nun die Zellen der HBO-Gruppe wie in Punkt 3.1.2.3 beschrieben in der Druckkammer behandelt. An den Tagen 1, 3, 5 und 7 wurde die Proliferation mittels WST-1-Assays bestimmt. Die Zellproben, die für die Genanalysen vorgesehen waren, wurden an den Tagen 1, 4 und 7 in RLT-Puffer kryokonserviert. Um den Zellen optimale Wachstumsbedingungen zu bieten, wurde an den Tagen 2, 4 und 6 in allen Proben ein Medienwechsel durchgeführt.

Als Standardversuchsbedingungen (siehe Abb. 8) wurde eine 7-tägige Behandlung von je 90 Minuten bei 3 bar Überdruck festgelegt (d.h. 2 bar Kammerüberdruck plus

1 bar Atmosphärendruck). Dieses Therapieschema entspricht in leicht abgewandelter Form dem in der Klinik angewandten Boerema Therapieschema (TS 300/90).

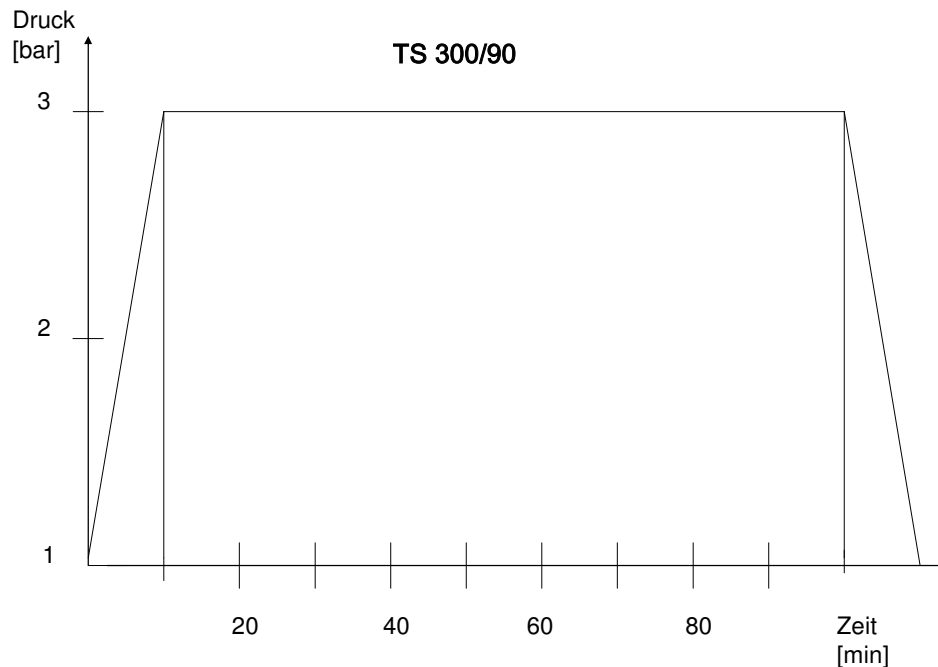


Abb. 8 Standardversuchsbedingungen TS 300/90, modifiziert nach dem Boerema Therapieschema

Davon ausgehend wurden die Effekte der Behandlung bei Variation der Behandlungsdauer (120 Minuten, 60 Minuten) und der Druckhöhe (1 bar) mit folgenden Therapieschemata untersucht:

- Behandlungsdauer 120 Minuten bei 3 bar Gesamtdruck: TS 300/120
- Behandlungsdauer 60 Minuten bei 3 bar Gesamtdruck: TS 300/60
- Behandlungsdauer 90 Minuten bei 2 bar Gesamtdruck: TS 200/90

3.1.2.3 Ausplattieren von Zellen für die Druckversuche

Für die Proliferationsassays wurden die Zellen in 96-well-Platten und für die molekularbiologischen Untersuchungen in Petrischalen ausplattiert. Ausgehend von einer Zellsuspension bekannter Zellzahl wurde eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 1×10^6 , 1×10^5 und 1×10^4 hergestellt.

In die 96-well-Platten wurden je 1×10^3 Zellen pro Well vorgelegt und anschließend mit Kulturmedium auf ein Gesamtvolumen von 200 µl aufgefüllt. Es wurden je 6 Löcher der Platte gleich bestückt (gleiche Zellart, gleiche Zellzahl, gleiches Medium), die zur Berechnung eines Mittelwertes dienen sollten. Pro Platte wurden 3 Wells zur photometrischen Bestimmung des Nullwertes mit Medium (ohne Zellen) versetzt. Nicht mit Zellmaterial versehene Wells wurden als Verdunstungsschutz mit 200 µl PBS aufgefüllt.

Für die Analyse der Genexpression wurden je 5×10^5 Zellen in insgesamt 15 ml Nährmedium in Petrischalen (6 Stück pro Zellart für einen Versuchsansatz) ausgesät.

Als Ausgangswert (Tag 0) wurden weitere 5×10^5 Zellen von jeder Zellart als gewaschenes Pellet in RLT-Puffer lysiert und bei -80°C zwischengelagert.

3.1.2.4 Durchführung der Druckversuche

Vor der Behandlung wurden die Zellproben der HBO-Gruppe direkt vom Brutschrank (37°C) in die Druckkammer (Raumtemperatur) überführt. Die Kontrollgruppen befanden sich während der Versuchszeit unter sterilen Bedingungen bei Raumluft und Raumtemperatur unter einer Laborwerkbank.

Um Kompressionsschäden an den Zellmembranen zu vermeiden, erfolgte ein langsamer Druckaufbau von 0,1 bar pro 30 Sekunden, welchem sich eine Isopressionsphase über eine definierte Zeitspanne (60, 90, oder 120 Min.) anschloss. Eventuelle Druckabfälle nach vollständiger Kompression wurden unmittelbar ausgeglichen. Durch regelmäßige Kontrollen konnte eine konstante Druckhöhe während der Behandlungsdauer sichergestellt werden. Nach Ende der Behandlungszeit erfolgte die vorsichtige Dekompression in Intervallen von 0,1 bar pro 30 Sekunden. Die Zellproben der HBO-, sowie der Kontrollgruppen wurden anschließend ohne Verzögerung in den Brutschrank überführt.

3.1.3 Proliferationsassay

3.1.3.1 Prinzip des WST-1-Proliferationsassays

Der von der Firma Roche bezogene WST-1 Proliferationsassay stellt ein nicht radioaktives, farbmétrisches Verfahren dar, mit dem die Proliferation, die Vitalität, oder auch die Chemosensibilität von Zellen quantitativ bestimmt werden können.

Das WST-1 Reagenz, ein schwach rotes Tetrazoliumsalz, wird von mitochondrialen Dehydrogenasen vitaler Zellen zu wasserlöslichem, dunkelroten Formazan gespalten (siehe Abbildung 8 [83]), wobei der entstandene Farbumschlag anschließend photometrisch gemessen wird und als proportional zur Zellzahl angesehen werden kann.

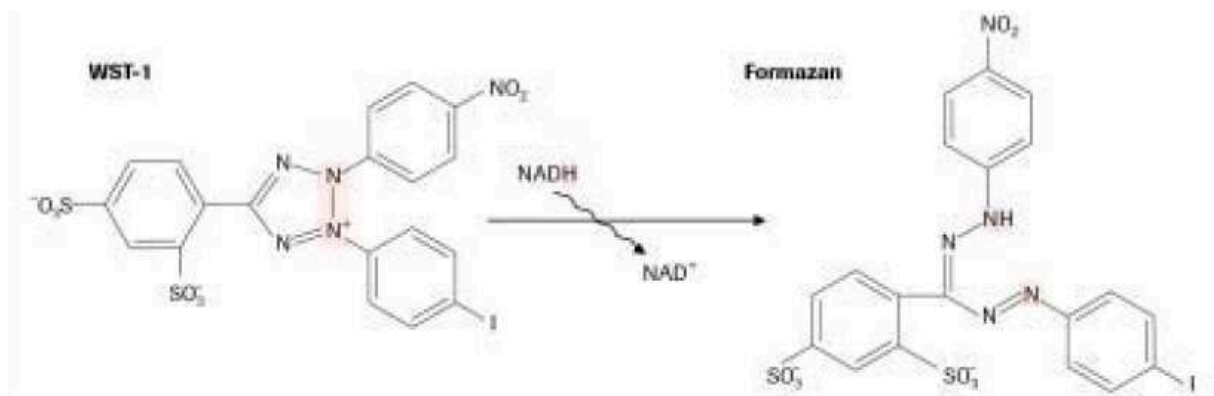


Abb. 9: WST-1 Proliferationsreagenz und sein Reaktionsprodukt Formazan (aus: Apoptosis Cell Death and Proliferation, 3rd Edition, Roche Applied Science [83])

3.1.3.3 Durchführung des Proliferationsassays

Die Proliferationsassays wurden direkt nach der hyperbaren Oxygenierung durchgeführt. Aus jedem Well wurden zunächst 100 µl Medium abpipettiert ohne die am Boden haftenden Zellen zu berühren. Anschließend wurde jedes Well mit 10 µl der WST-1-Lösung versetzt, wobei auf das Vermeiden von Luftblasen geachtet wurde. Die 96-well Platten wurden anschließend für 2 Stunden bei 37°C inkubiert.

Durch vorsichtiges Schwenken wurde das entstandene Formazan homogen im Überstand verteilt. Im Spektralphotometer E_{\max} wurden die Farbumschläge danach bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen und als „optische Dichte“ (= OD) dargestellt.

3.1.3.4 Erstellung einer Standardkurve zur Ermittlung der absoluten Zellzahl

Um die tatsächliche Zellzahl aus den gemessenen OD-Werten zu ermitteln, wurden für jede Zellart Standardkurven angelegt, indem Verdünnungsreihen von 1×10^6 bis 1×10^3 Zellen pro Milliliter Medium hergestellt wurden. So konnten bekannte Zellzahlen in 96-well-Platten überführt und die entsprechenden OD-Werte daraufhin durch den WST-1-Proliferationsassay ermittelt werden. Die Messgenauigkeit sollte durch eine Probenanzahl von $n=6$ optimiert werden. Die Zellzahlen und ihre zugehörigen OD-Werte wurden gemittelt und als zweidimensionaler Graph aufgetragen, welcher fortan als Standardkurve für die jeweilige Zellart diente.

Die in den Experimenten ermittelten OD-Werte wurden mit Hilfe des Softwareprogramms GraphPad Prism mit der Standardkurve verglichen und in die entsprechende Zellzahl umgerechnet.

3.1.4 Molekularbiologie

3.1.4.1 RNA Isolation

Mit Hilfe eines RNase Mini Kit (Firma Quiagen) wurde die RNA der Zellen nach Herstelleranweisungen isoliert.

Die Zellen wurden hierzu zunächst homogen in RLT-Puffer lysiert und anschließend im Verhältnis 1:1 mit 70%igem Ethanol vermischt. Das Lysat wurde daraufhin auf eine Silicagelmembran überführt, an welche sich die RNA anheftet. Durch mehrmaliges Waschen mit den Puffern „RW1“ und „RPE“ wurden verunreinigende Bestandteile (DNS etc.) aus der Probe entfernt, sodass reine RNA auf der Membran zurückblieb. Diese wurde mit RNase-freiem Wasser von der Membran eluiert und auf Eis gelagert.

Um die Gesamt-RNA Konzentration zu bestimmen wurde eine 1:25 Verdünnung der Proben hergestellt. Mit dem Photometer wurden die OD-Werte der Proben bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt und daraus die RNA Konzentrationen (c(RNA)) in den Proben errechnet.

Um zu bestimmen, welche Menge des Probenvolumens 1 µg RNA entspricht, wurde folgende Formel benutzt:

$$X (\mu\text{l}) = 1 / c(\text{RNA}) \times 1000$$

X (µl) entspricht 1µg RNA

3.1.4.2 Umschreiben von RNA in cDNA

Zum enzymatischen Umschreiben von RNA in cDNA wurde das „Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit“ der Firma Roche verwendet. Kernstück dieses Kits ist eine Enzymmischung aus Reverser Transkriptase und einem korrekturlesenden Enzym, welche laut Herstellerangaben die Genauigkeit der Synthese um ein Siebenfaches erhöht.

Von jeder Probe wurde 1 µg RNA (Berechnungsformel siehe 2.2.4.1) eingesetzt und zunächst mit 2 µl Random Primer versetzt, sowie falls erforderlich, mit PCR-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 11,4 µl verdünnt. Der Mastermix für die Reaktion wurde nach folgendem Schema vorbereitet:

Master Mix Ansatz (für 1 Probe)

| | |
|---------------------------|--------|
| RT-Puffer | 4 µl |
| Protector Rnase Inhibitor | 0,5 µl |
| Deoxynucleotide Mix | 2 µl |
| DTT | 1 µl |
| Rtranskriptase 20U/µl | 1,1µl |
| <hr/> | |
| Gesamtvolumen | 8,6 µl |

Jeweils 8,6 µl des Master Mix wurde anschließend mit der Mischung aus Primer und Probe homogenisiert. Im Anschluss daran wurde der Ansatz im Thermocycler inkubiert:

Programm

| Inkubationszeit (min) | Temperatur (°C) |
|-----------------------|-----------------|
| 30 | 50 |
| 5 | 85 |
| Standby | 4 |

Bis zur weiteren Verarbeitung konnte die entstandene cDNA bei -20°C zwischengelagert werden.

3.2.4.2 Real time PCR

Die Real Time PCR Technologie erlaubt eine quantitative Echtzeitanalyse der Polymerasekettenreaktion (PCR), indem Fluoreszenzsignale gemessen werden. Hierbei wird zum Ansatz der PCR neben den spezifischen Primern des nachzuweisenden Genes zusätzlich ein fluoreszierender Farbstoff, das SYBR-Green, gegeben, welcher in die DNA interkaliert. Hierdurch kann die Menge der amplifizierten DNA im Verlauf der PCR bestimmt werden und so auf die Menge des exprimierten Genes in der untersuchten Probe rückgeschlossen werden.

In den durchgeführten Versuchen wurde mit Primer Sets der Firma Search-LC gearbeitet. Es wurden die Gene für Collagen I und II, sowie COMP (cartilage oligomeric matrix proteine) als typische Marker für Chondrozyten untersucht. Die Apoptoserate wurde durch die Amplifikation der Genabschnitte für PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase) und Caspase-3 dargestellt. Als Haushaltsgen wurde humanes Cyclophilin B untersucht. Alle angegebenen Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Zunächst erfolgte das Ansetzen des SYBR-Green Mix nach Herstellerangaben, indem der aufgetaute Reaction Mix vorsichtig mit dem vorher zentrifugierten Enzym vermischt wurde. Aus der Standardprobe wurde im Folgenden eine Verdünnungsreihe hergestellt, die zur Berechnung der Steigungsgeraden (slope) nötig ist. Die zu untersuchenden Proben wurden, ebenso wie die Positiv- und die

Negativkontrolle 1:10 mit PCR-geeignetem Wasser verdünnt. Anschließend wurde der Master Mix für die eingesetzte Anzahl an Proben nach folgendem Schema hergestellt (beschrieben ist der Ansatz für eine Probe):

| | |
|----------------------------|------|
| PCR grade H ₂ O | 6 µl |
| Light Cycler Primer | 2 µl |
| SYBR Green Mix | 2 µl |
| | |

Die Proben, die Standardverdünnungsreihe, sowie die Positiv- und Negativkontrollen wurden jeweils im Verhältnis 1:1 mit dem Master Mix in Light Cycler Kapillaren pipettiert und für 30 Sekunden in einer Tischzentrifuge bei 2000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Rotor des Light Cycler Instrument mit den Kapillaren bestückt und das Programm nach folgendem Protokoll gestartet:

Denaturierung

| | |
|----------------------|-----|
| Zyklen | 1 |
| Zieltemperatur (° C) | 95 |
| Dauer (Sekunden) | 600 |

Amplifikation

| | | | |
|----------------------|-----------|-----------|-----------|
| Zyklen | 35 | | |
| | Segment 1 | Segment 2 | Segment 3 |
| Zieltemperatur (° C) | 95 | 68 | 72 |
| Dauer (Sekunden) | 10 | 10 | 16 |

Schmelzkurvenanalyse

| | | | |
|----------------------|-----------|-----------|-----------|
| Zyklen | 1 | | |
| | Segment 1 | Segment 2 | Segment 3 |
| Zieltemperatur (° C) | 95 | 58 | 95 |
| Dauer (Sekunden) | 0 | 10 | 0 |

Abkühlung

| | |
|----------------------|----|
| Zyklen | 1 |
| Zieltemperatur (° C) | 40 |
| Dauer (Sekunden) | 30 |

Während der ersten Phase wurden die Proben stark erhitzt, was zu deren Denaturierung, sowie zur Aktivierung der Polymerase führt. Der nächste Schritt dient der Amplifikation, sprich der gezielten Vervielfältigung des Zielgens. Um die Spezifität der Amplifikation zu untersuchen, folgt anschließend eine Schmelzkurvenanalyse.

Zur Auswertung der Resultate wurde die Fit Points Methode gewählt. Die Effizienz der Real Time PCR wurde mit Hilfe folgender Formel errechnet:

$$E = 10^{-1/\text{slope}}$$

Zur Interpretation der Ergebnisse erfolgte zunächst die „Normierung“ der Gene, d.h. die Expression des Zielgens wird ins Verhältnis gesetzt zur Expression des Haushaltsgenes. Anschließend wurde die normierten Zielgene der Kontrollgruppe und HBO-Gruppe verglichen.

3.1.5 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Softwareprogramms GraphPad Prism. Bei allen Ergebnissen der Proliferationsassays wurde der „Wilcoxon matched pairs test“, ein nichtparametrischer t-Test mit gepaarten Stichproben, durchgeführt.

Bei den Ergebnissen der molekularbiologischen Untersuchungen wurde jeweils der Student's t-Test durchgeführt, dessen Konfidenzintervall 95% betrug.

Ein Unterschied zwischen den Proben wurde bei einem p-Wert $< 0,05$ als signifikant angesehen.

3.2. Materialien

3.2.1 Verbrauchsmaterialien

| Produkt | Hersteller |
|--|------------------------------------|
| 96-well Platten | NUNC, Roskilde,Dänemark |
| Aqua ad iniectabilia | Braun Melsungen AG,Melsungen |
| Cryo Tubes 1,8 ml | NUNC, Roskilde,Dänemark |
| Einwegskalpelle Größe 15 und 20 | Medizin AG, Köln |
| Eppendorf Tubes 1,5 und 2,0 ml | Eppendorf, Hamburg |
| Falcon Röhrchen 50 ml | Becton Dickinson Labware, NJ, USA |
| Flüssiger Stickstoff | Air Liquide, Düsseldorf |
| Light cycler Kapillaren 20 µl | Roche Diagnostics, Mannheim |
| Medizinischer Sauerstoff | Linde, 85716 Unterschleißheim |
| PCR Tubes | G. Kisker GbR, Steinfurt |
| Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl | Gilson, Frankreich |
| Pipettenspitzen 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml Costar Stripette | Corning Incorporated, NY, USA |
| Pipettenspitzen DNase-, RNase-, pyrogenfrei 10 µl, 20 µl, 100 µl | G.Kisker, Steinfurt |
| Pipettenspitzen DNase-, RNase-, pyrogenfrei 2,5 µl | Biozym Scientific GmbH, Oldendorf |
| Sterile Einwegpinzetten | Angiokard Medizintechnik, Freiburg |
| Sterile Filtereinheit 0,2 µm | Whatman GmbH, Dassel |
| Sterile Spritzen, 10 ml | Becton Dickinson, Spanien |
| Steriles Abdecktuch | Sengewald, Rohrdorf-Thansau |
| Wägebapier 9 x 11,5 cm | Macherey Nagel, Düren |
| Zellkulturflaschen (80 cm ² , 175 cm ² , 500 cm ²) | NUNC, Roskilde,Dänemark |
| Zentrifugenröhrchen 15 ml | TTP, Trasadingen, Schweiz |

3.2.2. Geräte

| Produkt | Hersteller |
|--|---------------------------------------|
| Autoklav | H+P Labortechnik, Oberschleißheim |
| Brutschrank | Binder, Tuttlingen |
| Brutschrank | Binder, Tuttlingen |
| Druckkammer Haux Testcom 200 | HAUX LIFE SUPPORT GmbH, Karlsbad |
| E _{max} ELISA Reader | MWG Biotech, München |
| Erlenmeyerkolben | Schott Duran, Wertheim |
| Feinwaage | Sartorius GmbH, Göttingen |
| Gefrierschrank HERAfreeze -80°C | Heraeus, Hanau |
| Lichtmikroskop Axiovert 40 CFL | Zeiss, Göttingen |
| Light Cycler Modell 2.0 | Roche Diagnostics, Mannheim |
| Light Cycler Zentrifugenadapter | Roche Diagnostics, Mannheim |
| Mixer VTX-300L | LMS, |
| Neubauer Zählkammer | Karl Hecht Assistnet, Altnau, Schweiz |
| Pipette 2 µl, 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl | Gilson, Frankreich |
| Pipettus accu-jet pro, elektrisch | Brand, Wertheim |
| RNA/DNA Calculator | LKB Biochrom, England |
| Sterile Werkbank HERAsafe | Heraeus, Hanau |
| Thermo Cycler " DNA Engine" | BioRad Laboratories, Inc., München |
| Thermomixer | Eppendorf, Hamburg |
| Tischzentrifuge | Labnet International, Inc., NJ, USA |
| Wasserbad Julabo TW20 | Julabo, Seelbach |
| Zentrifuge 5417R | Eppendorf, Hamburg |

3.2.3 Chemikalien und Reagenzien

| Produkt | Hersteller |
|---------------|---|
| Ascorbinsäure | SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim |

| | | | |
|---|-------------------------|-------------------------|--------------------------------|
| N-Acetyl-L-Cystein | SIGMA-ALDRICH | CHEMIE | GmbH, Steinheim |
| Amphotericin B Lösung 250 µg/ml | SIGMA-ALDRICH | CHEMIE | GmbH, Steinheim |
| MEM-Aminosäuren | BIOCHROM AG, | | Berlin |
| Trypsin-EDTA Lösung (10x) | BIOCHROM AG, | | Berlin |
| L-Glutamine 200 mM | BIOCHROM AG, | | Berlin |
| WST-1 Cell Proliferation Reagent | Roche Diagnostics GmbH, | IN, USA | |
| Fötale Kälberserum (FCS) | PAA Laboratories GmbH, | Pasching, Österreich | |
| Phosphat-gepufferte-Salzlösung (PBS) | Apotheke | Innenstadt, Uni | München, München |
| Penicillin-Streptomycin 10.000 U/ml | BIOCHROM AG, | | Berlin |
| DULBECCO'S MEM (1x) (DMEM) | BIOCHROM AG, | | Berlin |
| DMEM/HAM'S F-12 (1:1) (DMEM/HAM'S) | BIOCHROM AG, | | Berlin |
| Ethanol (Oberflächendesinfektion) | Apotheke | Universität | München Innenstadt, München |
| light cycler FastStart DNA Master ^{PLUS} | Roche Diagnostic, | | Mannheim |
| SYBR Green I | | | |
| 2-Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich, | | Steinheim |
| Trypan Blau 0,4 % | Invitrogen, | | Karlsruhe |

3.2.4 Fertigkombinationen von Biochemikalien

| Produkt | Hersteller |
|--|----------------------------------|
| Rneasy Mini Kit | Quiagen GmbH, Hilden |
| Transkriptor High Fidelity cDNA synthesis Kit | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| Light Cycler Primer Sets (siehe 2.1.8) | Search LC, Heidelberg |
| Reverse Transkription System | Promega, Madison, USA |

3.2.5 Software

| Software | Hersteller |
|-----------------------------------|------------------------------|
| Prism 3.0 | Graph Pad |
| Office Version 2003 | Microsoft |
| Softmax Pro 4 | Molecular Devices |
| Light cycler software version 3.5 | Roche Molecular Biochemicals |
| Reference manager 11 | Thomson ResearchSoft |

3.2.6 Zellkulturen

| Zellen | bezogen von | Lot-Nummer | Passage |
|---------------------|--------------------------------|------------|---------|
| humane Fibroblasten | Provitro, Berlin | 051H140100 | 2 |
| humane Chondrozyten | Provitro, Berlin | 903G091107 | 2 |
| humane Chondrozyten | aus Spendergewebe (siehe oben) | | |

Alle verwendeten Zellen wurden auf HIV, sowie Hepatitis B und C getestet und bei negativem serologischen Befund für die Versuche herangezogen.

3.2.7 Kulturmedien

| Kulturmedium | Inhalt |
|--------------------|-------------------------|
| Fibroblastenmedium | DMEM |
| | FCS 10% |
| | Penicillin/Streptomycin |
| | 500 ml |
| | 50 ml |
| | 3 ml |

| | | |
|-----------------------------|------------------------------------|--------|
| Einfriermedium Fibroblasten | Fibroblastenmedium 70% | 35 ml |
| | FCS 20% | 10 ml |
| | DMSO 10% | 5 ml |
| Chondrozytenmedium (CM) | DMEM/HAM'S | 500 ml |
| | Aminosäuren 1% | 5 ml |
| | L-Glutamin 1% | 5 ml |
| | Ascorbinsäure (25 mg/ml) | |
| | Penicillin/Streptomycin (50 IU/ml) | 3 ml |
| | Amphotericin B (2500 µg/ml) | 50 µl |
| | FCS 10% | 50 ml |
| Einfriermedium Chondrozyten | Chondrozytenmedium 70% | 35 ml |
| | FCS 20% | 10 ml |
| | DMSO 10% | 5 ml |

3.2.8 Primer

| Gen | | Abkürzung | Hersteller | Lot-Nummer | Kopien/µl Standard |
|---------------------------|-----------|-----------|---------------|------------|-----------------------|
| Human | Cartilage | COMP | Search- LC | 051108 | 43000 cp/µl |
| Oligomeric Matrix Protein | | | | | |
| Human | Cartilage | COMP | Search- LC | 251006 | 17000 cp/µl |
| Oligomeric Matrix Protein | | | | | |
| Human | Caspase 3 | CASP3 | Search- LC | 200308 | 61000 cp/µl |

| | | | | |
|--|-------|-----------|--------|--------------|
| Human Collagen I a 1 | | Search-LC | 020608 | 21000 cp/μl |
| Human Collagen II a 1 | | Search-LC | 250908 | 37000 cp/μl |
| Human Cyclophilin B | CPB | Search-LC | 020708 | 226000 cp/μl |
| Human Cyclophilin B | CPB | Search-LC | 281107 | 350000 cp/μl |
| Human Poly (ADP-Ribose) Polymerase Family, Member 1 | PARP1 | Search-LC | 200308 | 92000 cp/μl |

4. Ergebnisse

4.1 Kultivierung humaner Chondrozyten und Fibroblasten

Für die Druckversuche wurden humane Chondrozyten und Fibroblasten eingesetzt, nachdem zur Etablierung der Methode bereits Vorversuche mit humanen Fibroblasten erfolgt waren. Die Knorpelzellen wurden zum Teil industriell bezogen und zum Teil aus Patientenmaterial isoliert.

Aus humanem Gewebe konnte eine Gesamtzellzahl von $1,4 \times 10^6$ vitaler Chondrozyten isoliert werden, während die industriell bezogenen Zellen nach dem Auftauen nur noch zu ca. 75% vitale Zellen zeigten.

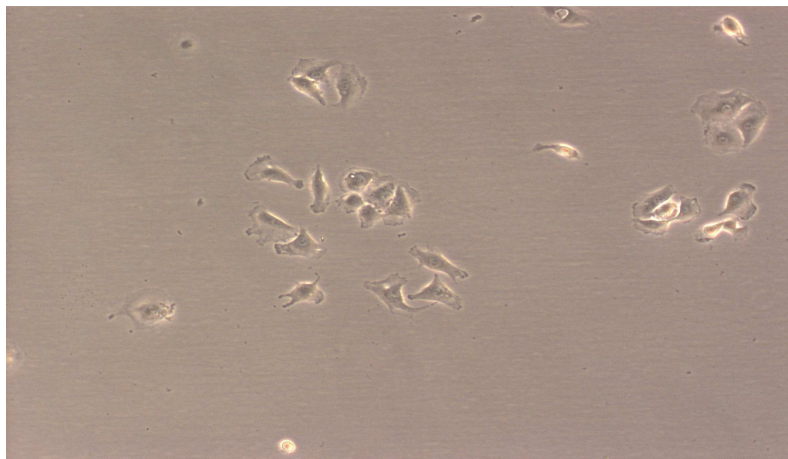


Abb. 10 humane Chondrozyten (aus Spendergewebe isoliert) in Monolayerkultur; gruppierte Anordnung der rundlichen Zellen

Alle Zellen wurden in *Monolayer*-Kulturen ausgesät, wobei die Zellen unterschiedlicher Herkunft getrennt kultiviert wurden. Nach 5-tägiger Inkubation war die Mehrzahl der Zellen am Boden der Kulturgefäße adhärent. Vereinzelte nicht adhärente Zellen wurden durch Wechseln des Kulturmediums verworfen.

Nach einer Inkubationszeit von einer Woche konnte bei den aus Patientenmaterial isolierten Zellen lichtmikroskopisch keine wesentliche Veränderung der Zellform beobachtet werden (vgl. Abb. 9) und nach ca. 3 Wochen Kultivierungszeit hatten

diese Zellen die erwünschte Konfluenz erreicht, sodass sie in der ersten Passage für die Druckversuche herangezogen werden konnten.

Die industriell bezogenen Chondrozyten konnten bereits nach einer Kultivierungsphase von einer Woche, jedoch in der dritten Passage für die Druckversuche eingesetzt werden. Diese Zellen zeigten nach sieben Tagen eine gruppierte Anordnung, sowie ein leicht spindelförmiges, fibroblastenähnliches Aussehen unter lichtmikroskopischer Kontrolle (siehe Abb. 11).

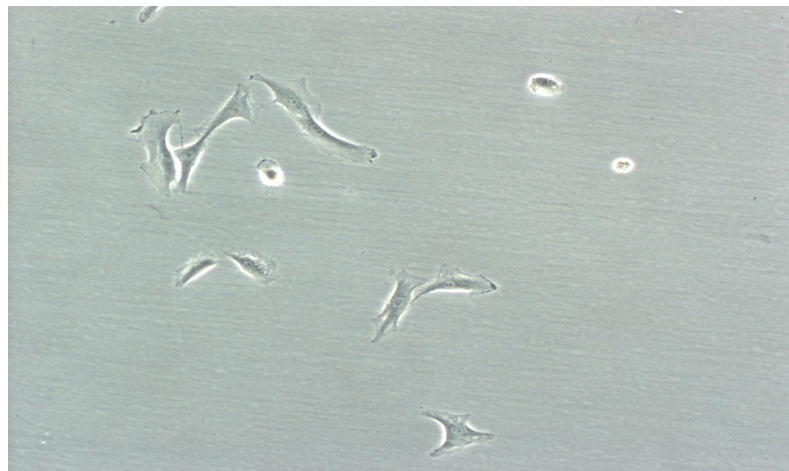


Abb. 11 Humane Chondrozyten (industriell bezogen) in Monolayerkultur; beginnende spindelförmige Morphologie der Zellen

Die eingesetzten Fibroblasten wurden industriell bezogen und konnten auch in höheren Passagen erfolgreich kultiviert werden. Erkennbar an ihrem spindelförmigen Erscheinungsbild, zeigten die Fibroblasten im Vergleich zu den Chondrozyten eine raschere Proliferation (vgl. Abb. 12).

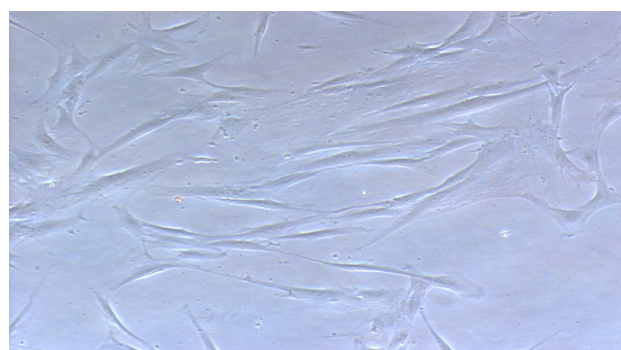


Abb. 12 Humane Fibroblasten in Monolayerkultur, typische spindelförmige Zellform

4.2 Etablieren der Hyperbaren Oxygenierung

Die hyperbare Oxygenierung mit Hilfe der Druckkammer HAUX TESTCOM 200/2 konnte für alle gewählten Druckhöhen und Behandlungsdauern erfolgreich durchgeführt werden. Ein geringfügiges Absinken des Druckes von maximal 0,05 bar konnte gelegentlich wenige Minuten nach Erreichen des gewünschten Überdruckes während der Isopressionsphase beobachtet werden. Dies wurde stets umgehend korrigiert, sodass ein konstanter Überdruck in der Testkammer herrschte. Die mit Hilfe eines Thermometers in der Druckkammer gemessenen Temperaturveränderungen beliefen sich während der Kompressionsphasen auf maximal 1,5 ° C.

4.3 Proliferationsassays

Durch den Einsatz des WST-1 Proliferationsassays der Firma Roche wurde die Proliferation der behandelten und unbehandelten Zellen bestimmt und miteinander verglichen. Der gemessene Farbumschlag des Reagenzes konnte hierbei als direkt proportional zur Anzahl vitaler Zellen angesehen werden.

4.3.1 Erstellung von Standardkurven zur Ermittlung der absoluten Zellzahlen

Mit Hilfe eines Photometers wurde der Farbumschlag des Proliferationsreagenzes gemessen und als *optische Dichte*-Wert (im folgenden OD-Wert genannt) wiedergegeben. Um von den gemessenen OD-Werten auf die tatsächliche Zellzahl schließen zu können wurden für die Chondrozyten und Fibroblasten Standardkurven angelegt. Nach dem Herstellen von Verdünnungsreihen jeder Zellart wurden hierzu WST-1 Assays durchgeführt und aus je sechs Messungen zu einer bekannten Zellzahl der zugehörige OD-Wert gemittelt. Aus diesen Werten konnten folgende Standardkurven durch das Softwareprogramm GraphPad Prism erstellt werden:

Abbildung 13

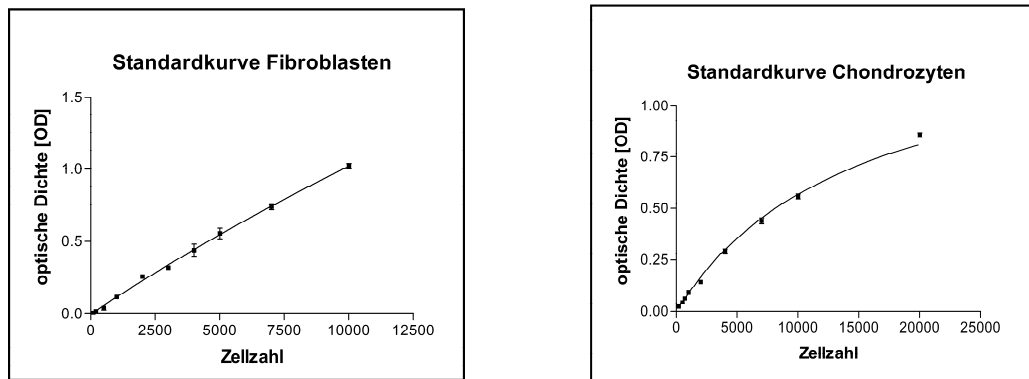


Abb. 13: links: Standardkurve zur Ermittlung der Zellzahl für humane Fibroblasten;
rechts: Standardkurve zur Ermittlung der Zellzahl für humane Chondrozyten

4.3.2 Vorversuche: Proliferation humaner Fibroblasten

Um die Methodik der hyperbaren Oxygenierung zu etablieren, wurden Vorversuche mit humanen Fibroblasten durchgeführt. Zunächst wurde für sieben aufeinander folgende Tage das Therapieschema TS (300/90) appliziert. Zum Vergleich wurde eine Kontrollgruppe von Fibroblasten der gleichen Passage für die Zeit der Behandlung bei Raumluft und atmosphärischem Druck unter einer sterilen Werkbank gehalten (siehe Abb. 14).

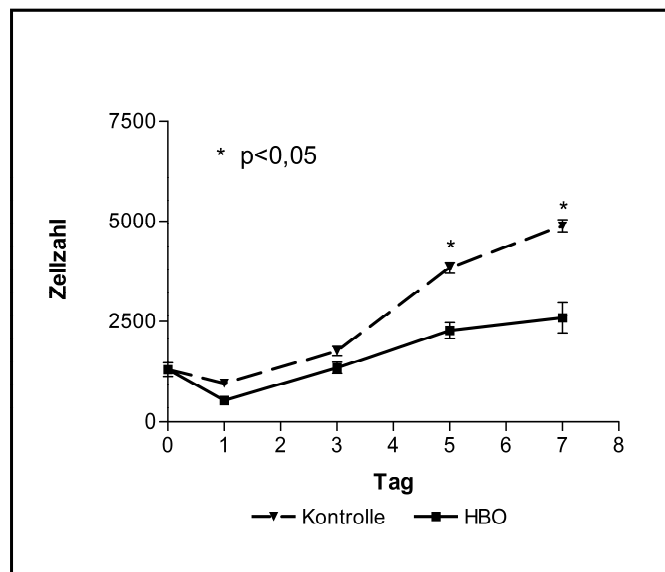


Abb. 14: Proliferation humaner Fibroblasten nach 7-tägiger HBO Behandlung TS 300/90 im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe;

***Signifikanzwert $p < 0,05$**

Am Tag nach der Aussaat konnte in beiden Vergleichsgruppen nur eine geringere Anzahl an vitalen Zellen im Vergleich zu Tag 0 nachgewiesen werden. Ab Tag 2 konnte sowohl in der HBO-Gruppe, als auch in der Kontrollgruppe ein annähernd linearer Anstieg der Zellzahl beobachtet werden, wobei die unbehandelten Fibroblasten gegenüber der HBO-Gruppe eine deutlich raschere Proliferation zeigten. Nach sieben Tagen war die Zellzahl in der mit HBO behandelten Gruppe um das 2,5-fache gestiegen, wohingegen die Zellzahl der Kontrollgruppe um das Fünffache expandierte.

Um Aufschluss darüber zu erhalten, ob die Höhe des applizierten Drucks die Proliferation humaner Fibroblasten beeinflusst, wurden folgende Gruppen gegenübergestellt (siehe Abb. 15):

- Gruppe A: Humane Fibroblasten, 7-tägige Behandlung mit TS 300/90
- Gruppe B: Humane Fibroblasten, 7-tägige Behandlung mit TS 200/90
- Gruppe C: Kontrollgruppe, humane Fibroblasten, keine HBO Behandlung

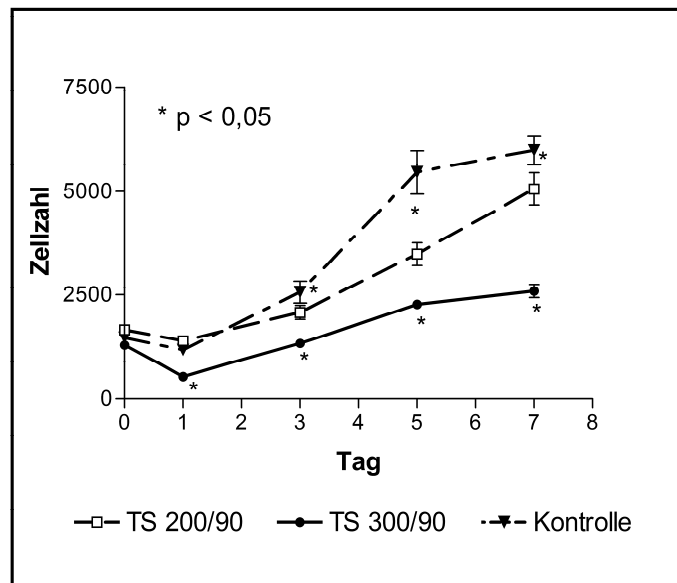


Abb. 15: Einfluss der Druckhöhe auf die Proliferation humaner Fibroblasten TS 300/90 vs. TS 200/90; * Signifikanzwert $p < 0,05$

Wie auch schon bei allen oben genannten Gruppen zeigte sich am Tag 1 eine deutlich geringere Proliferation in allen Gruppen im Vergleich zu Tag 0. Gruppe A erreichte erst am Ende der Versuchswoche eine Verdoppelung der Zellzahl, wohingegen Gruppe B und C bereits nach Tag 3 einen linearen Anstieg in der Zellzahl aufwiesen. Insgesamt zeigte Gruppe A über den gesamten Beobachtungszeitraum eine signifikant langsamere Proliferation im Vergleich zu Gruppe B und C. Während die Anzahl an vitalen Zellen an Tag 1 noch annähernd gleich war, so zeigte sich im weiteren Verlauf auch in Gruppe B eine signifikant verzögerte Proliferation im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Durch die Gegenüberstellung folgender Versuchsgruppen sollte ein potentieller Einfluss der Behandlungsdauer auf die Proliferation humaner Fibroblasten untersucht werden (siehe Abb. 16):

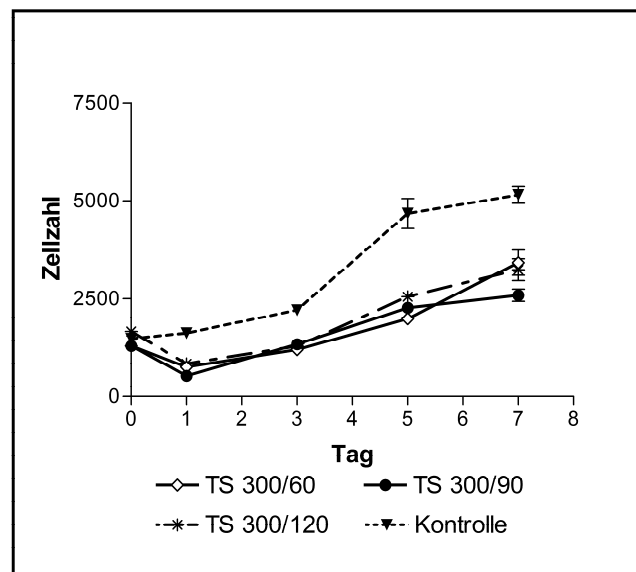


Abb. 16: Einfluss der Behandlungsdauer auf die Proliferation humaner Fibroblasten TS 300/60 vs. TS 300/90 vs. TS 300/120

- Gruppe A: Humane Fibroblasten, 7-tägige Behandlung TS 300/60
- Gruppe B: Humane Fibroblasten, 7-tägige Behandlung TS 300/90
- Gruppe C: Humane Fibroblasten, 7-tägige Behandlung TS 300/120
- Gruppe D: Kontrollgruppe, humane Fibroblasten, keine HBO Behandlung

Alle drei HBO Gruppen zeigten im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe eine signifikant verzögerte Proliferation. Zwischen den Gruppen A, B und C konnte kein signifikanter Unterschied in der Proliferation gezeigt werden.

4.3.3 Proliferation humaner Chondrozyten nach Hyperbarer Oxygenierung (TS 300/90)

Sechs Stunden nach Ausplattieren der aus Patientenmaterial isolierten Chondrozyten (Tag 0) wurde ein WST-1 Assay zur Ermittlung der Ausgangszellzahl durchgeführt. Nach Tag 1 konnte sowohl in der HBO-, als auch in der Kontrollgruppe ein deutlicher Abfall der Zahl vitaler Zellen beobachtet werden. Erst nach einer Inkubations- bzw. Behandlungszeit von drei Tagen konnte bei allen Zellen- behandelt

genauso wie unbehandelt- eine Proliferationsrate gemessen werden, welche der an Tag 0 entsprach (Abb. 17).

Eine Verdoppelung der Zellzahl konnte in beiden Gruppen nach fünf Tagen in Kultur nachgewiesen werden, jedoch zeigte sich nach der dritten Behandlung mit hyperbarem Sauerstoff, sowie zu allen folgenden Messzeitpunkten eine signifikant verminderte Proliferation der HBO-Gruppe im Vergleich zu Kontrollgruppe.

Zudem konnte beobachtet werden, dass die Proliferation der Chondrozyten der HBO-Gruppe nach Tag fünf stagnierte, während die Chondrozyten in der Kontrollgruppe weiterhin ein annähernd lineares Wachstum aufwiesen.

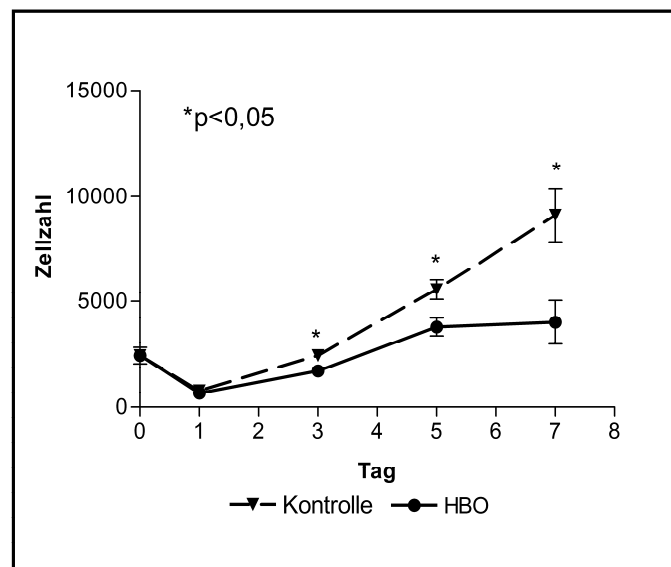


Abb. 17: Proliferation humaner Chondrozyten nach 7-tägiger HBO Behandlung TS 300/90 im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe

4.3.4 Der Einfluss der Druckhöhe auf die Proliferation humaner Chondrozyten

Um darzustellen, welchen Einfluss der applizierte Überdruck auf das Proliferationsverhalten humaner Chondrozyten hat, wurden Zellen mit unterschiedlichen Therapieschemata behandelt und anschließend untereinander,

sowie mit einer unbehandelten Kontrollgruppe verglichen. Folgende Gruppen wurden vergleichend gegenübergestellt (vgl. Abb. 18):

- Gruppe A: Humane Chondrozyten, 7-tägige Behandlung mit TS 300/90
- Gruppe B: Humane Chondrozyten, 7-tägige Behandlung mit TS 200/90
- Gruppe C: Kontrollgruppe humane Chondrozyten, keine HBO Behandlung

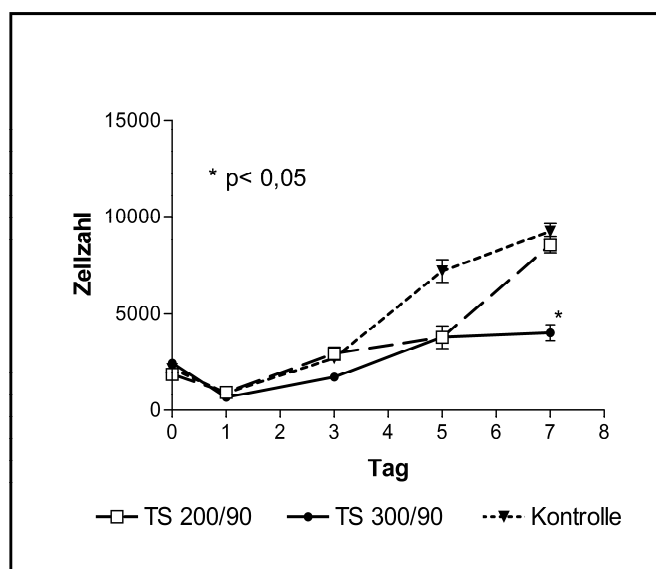


Abb. 18: Einfluss der Druckhöhe auf die Proliferation humaner Chondrozyten TS 200/90 vs. TS 300/90 vs. Kontrollgruppe

In allen drei Gruppen konnte einen Tag nach der Aussaat im Vergleich zu Tag 0 eine deutlich geringere Anzahl vitaler Zellen gemessen werden. Gruppe B und C zeigten nach drei Tagen eine annähernd gleiche Proliferationsrate, wohingegen in Gruppe A weniger vitale Zellen nachgewiesen werden konnten. Das Proliferationsverhalten der Chondrozyten in Gruppe B und C zeigte mit Ausnahme von Messtag 5 bis zum Ende der Messungen keine signifikanten Unterschiede, während die Zellen in Gruppe A über den gesamten untersuchten Zeitraum die geringste Proliferation zeigten.

4.3.5 Der Einfluss der Behandlungsdauer auf die Proliferation humaner Chondrozyten

Um den Effekt der Behandlungsdauer der Hyperbaren Oxygenierung auf die Proliferation humaner Chondrozyten zu untersuchen, wurden folgende Versuchsgruppen gegenübergestellt (Abb. 19):

- Gruppe A: Humane Chondrozyten, 7-tägige Behandlung mit TS 300/60
- Gruppe B: Humane Chondrozyten, 7-tägige Behandlung mit TS 300/90
- Gruppe C: Humane Chondrozyten, 7-tägige Behandlung mit TS 300/120
- Gruppe D: Kontrollgruppe humane Chondrozyten, keine HBO Behandlung

Nach Tag 1 wiesen alle Versuchsgruppen deutlich weniger vitale Zellen auf als direkt nach der Aussaat. Während nach der ersten hyperbaren Oxygenierung noch kein

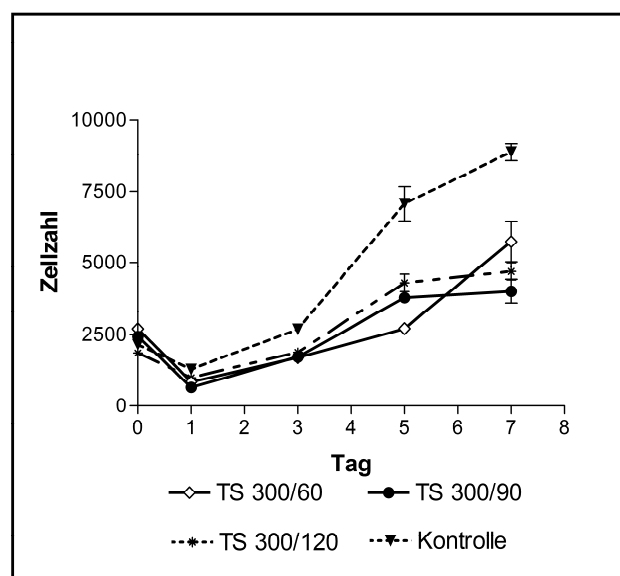


Abb. 19: Einfluss der Behandlungsdauer auf die Proliferation humaner Chondrozyten TS 300/60 vs. TS 300/90 vs. TS 300/120

Unterschied zwischen den Druckgruppen und der Kontrollgruppe erkennbar war, konnte bereits nach der dritten Behandlung eine deutlich raschere Proliferation der Kontrollgruppe im Vergleich zu allen behandelten Gruppen gesehen werden. An den

restlichen Messtagen wurden in den mit HBO behandelten Gruppen ebenso deutlich weniger vitale Zellen als in der Kontrollgruppe nachgewiesen. Zwischen den Gruppen A, B und C zeigte sich hinsichtlich der Proliferation bis zur dritten Druckbehandlung kein Unterschied. Nach Tag 5 konnten in den Gruppen, die für längere Zeit mit hyperbarem Sauerstoff behandelt wurden mehr vitale Zellen gemessen werden, was sich am letzten Messtag mit Ausnahme der Gruppe A bestätigte. Jedoch wiesen die Unterschiede zwischen den Gruppen keine ausreichende Signifikanz auf.

4.4 Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen

4.4.1 Einfluss der Hyperbaren Oxygenierung auf die Expression von Chondrozytenmarkern

4.4.1.1 Kollagen Typ II

Die Kollagenfibrillen des menschlichen Gelenkknorpels werden vor allem aus den Kollagentypen II, IX und XI gebildet. Um Aufschluss darüber zu erlangen, welchen Einfluss die hyperbare Oxygenierung auf die Kollagensynthese humaner Chondrozyten hat, wurde stellvertretend das Genexpressionsmuster von Kollagen Typ II molekularbiologisch identifiziert.

Bereits vor der ersten Druckbehandlung wurde die Synthese von Kollagen Typ II untersucht, um sicherzustellen, dass es sich bei den eingesetzten Chondrozyten um Zellen des hyalinen Gelenkknorpels handelt.

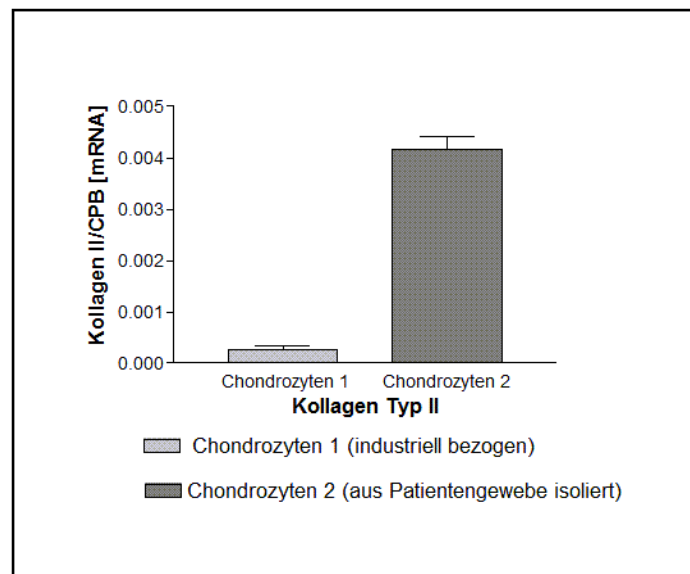


Abb. 20: Unterschiede in der Kollagenexpression humaner Chondrozyten vor Versuchsbeginn

Jedoch konnte nur bei den humanen Chondrozyten, die eigenständig aus humanem hyalinem Gelenksknorpel isoliert wurden, eine ausreichende Expression von Kollagen Typ II nachgewiesen werden, während in bei industriell bezogenen Chondrozyten mittels Light Cycler PCR nur eine sehr geringe Menge an Kollagen Typ II gemessen werden konnte (vgl. Abb. 20).

Nach einer 7-tägigen Behandlung der humanen Chondrozyten mit dem Therapieschema TS 300/90 zeigte sich folgendes Bild der Kollagenexpression: Abb. 21

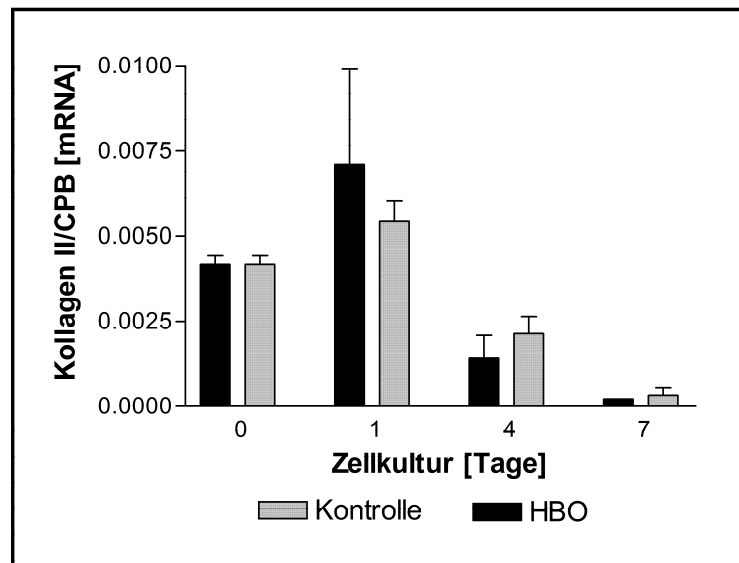


Abb. 21: Genexpression von Kollagen Typ II im Verlauf der 7-tägigen HBO Behandlung TS 300/90 verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe

Nach Tag 1 der Behandlung zeigte sich zunächst eine um 25% gesteigerte Kollagen Typ II-Expression. Im Verlauf war eine kontinuierlich geringer werdende Expression des Genes für Kollagen Typ II kennzeichnend, so dass am letzten Messtag kaum noch Kollagen II RNA nachweisbar war. Zwischen der HBO Gruppe und der unbehandelten Kontrollgruppe konnte zu keinem Messzeitpunkt ein signifikanter Unterschied gezeigt werden.

Des Weiteren sollte verglichen werden, ob die Variation des applizierten Überdruckes Einfluss auf die Expression von Kollagen Typ II hat (vgl. Abb. 22)

Durch die Behandlung nach dem Schema TS 300/90 konnte im Vergleich zur Behandlung mit TS 200/90 am Messtag 1 und 7 eine gesteigerte Expression von Kollagen Typ II beobachtet werden, wobei die Unterschiede nur nach der ersten Behandlung Signifikanz besaßen (so wurde Tag 1 eine doppelt so hohe RNA Konzentration in der Gruppe TS 300/90 gemessen). Im zeitlichen Verlauf war die Kopienanzahl allerdings in beiden behandelten Gruppen kontinuierlich rückläufig. Nach sieben Tagen konnte in beiden Gruppen weniger als ein Viertel der ursprünglichen Menge (Tag 1) an RNA nachgewiesen werden.

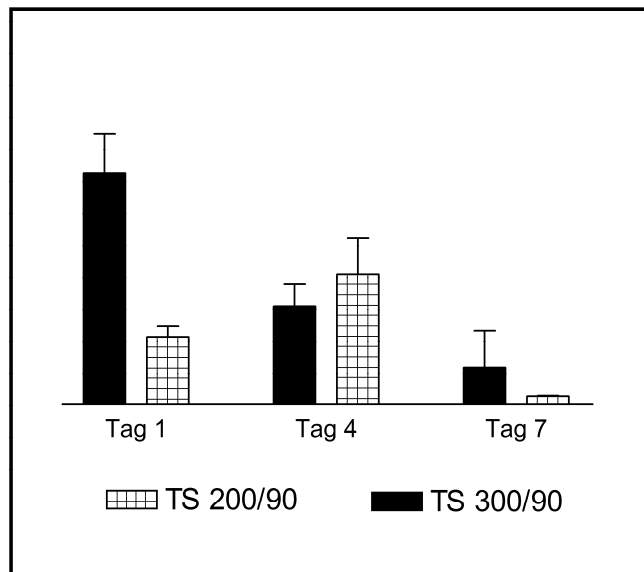


Abb. 22: Einfluss der Druckhöhe auf die Genexpression von Kollagen Typ II; TS 200/90 vs. TS 300/90; $p < 0,05$ nur an Messtag 1

Ob die Behandlungsdauer Einfluss auf die Synthese von Kollagen Typ II nimmt, soll durch die Gegenüberstellung der Behandlungsgruppen TS 300/60, TS 300/90 und TS 300/120 untersucht werden (vgl. Abb. 23).

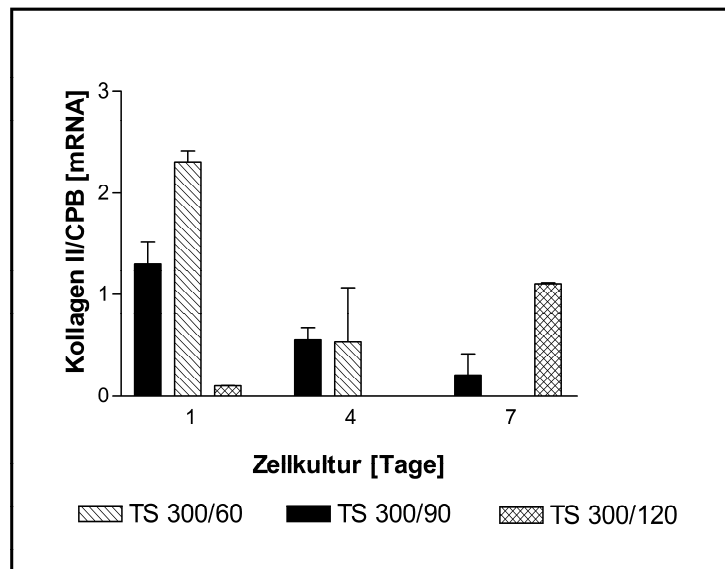


Abb. 23: Einfluss der Behandlungsdauer auf die Expression von Kollagen Typ II TS 300/60 vs. TS 300/90 vs. TS 300/120

Mit Ausnahme der Gruppe TS 300/120 nimmt die Kollagensynthese in allen drei behandelten Gruppen innerhalb einer Woche kontinuierlich ab. Während für die Gruppe TS 300/120 an Messtag 4 und für die Gruppe TS 300/60 an Messtag 7 kein Nachweis von Kollagen Typ II erfolgen konnte, scheint in der Gruppe TS 300/60 die höchste Expression von Kollagen Typ II zu bestehen, wobei ein signifikanter Unterschied nur an Behandlungstag 1 nachgewiesen werden konnte.

4.4.1.2 Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP)

COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein) ist ein Glykoprotein der extrazellulären Matrix und gilt als früher Chondrozytenmarker. Um zu untersuchen, ob die COMP Synthese humaner Chondrozyten durch die Behandlung mit hyperbarem Sauerstoff beeinflusst wird, wurde eine Gruppe Chondrozyten, die für sieben Tage mit dem Therapieschema TS 300/90 behandelt wurden, mit einer unbehandelten Kontrollgruppe verglichen (siehe Abb. 24).

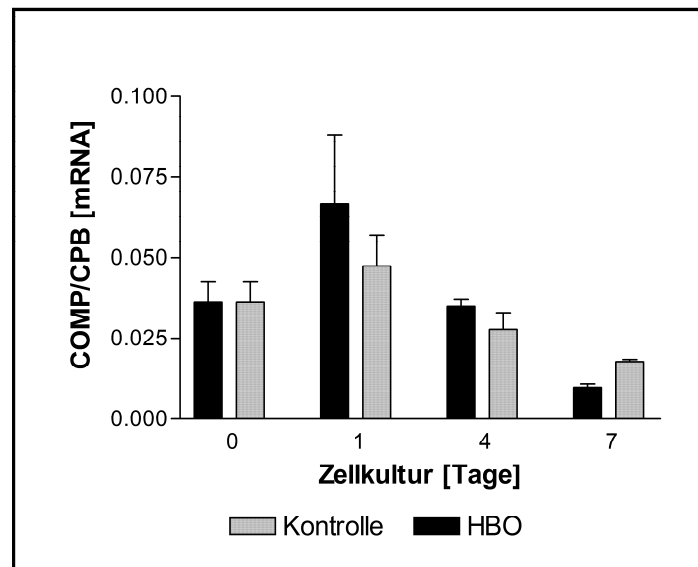


Abb. 24: Genexpression von COMP im Verlauf der 7-tägigen HBO Behandlung TS 300/90

Nach der ersten hyperbaren Oxygenierung zeigte die HBO Gruppe im Vergleich zu Tag 0 zunächst eine um ca. 30% gesteigerte Genexpression von COMP. Auch in der Kontrollgruppe konnte ein leichter Anstieg in der Genexpression beobachtet werden, welcher jedoch geringer ausgeprägt war als in der behandelten Gruppe. Nach vier Tagen in Kultur konnte in beiden Gruppen eine ähnlich hohe Expression von COMP wie an Tag 0 nachgewiesen werden, wobei die COMP Synthese in beiden Gruppen im weiteren Verlauf insgesamt deutlich rückläufig war und schließlich nur noch halb so viele Kopien von COMP nachgewiesen wurden wie an Tag 0. Zwischen der HBO Gruppe und der Kontrollgruppe konnte jedoch an keinem der Messtage ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

Es sollte zudem untersucht werden, ob die Variation des applizierten Überdrucks Einfluss auf die COMP Synthese nimmt. Hierzu wurde die Genexpression von COMP in der Gruppe TS 300/90 mit der Gruppe TS 200/90 verglichen (Abb. 25).

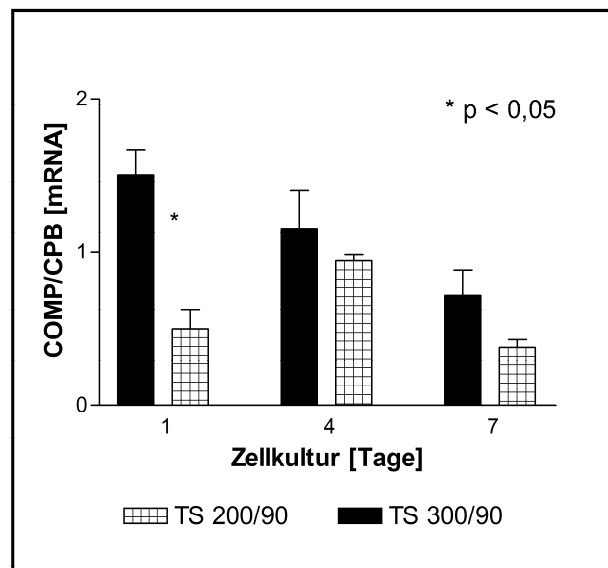


Abb. 25: Einfluss der Druckhöhe auf die Genexpression von COMP; TS 200/90 vs. TS 300/90

Über den Versuchszeitraum zeigte sich in beiden behandelten Gruppen ein Rückgang in der COMP Synthese. In der TS 300/90 Gruppe konnte nach sieben Behandlungstagen 50% weniger COMP RNA gemessen werden als an Tag 1. Bei den Chondrozyten, die einem höheren Druck ausgesetzt waren (TS 300/90), konnte an allen Messtagen eine höhere Genexpression von COMP nachgewiesen werden, als bei denen der Gruppe TS 200/90 - signifikant waren diese Ergebnisse allerdings nur an Tag 1; hier zeigte sich in der Gruppe, die mit höherem Druck behandelt wurde eine um 2/3 höhere Konzentration an COMP RNA als in der Vergleichsgruppe.

Hinsichtlich der Genexpression von COMP wurden auch die Gruppen von Chondrozyten verglichen, die über sieben Tage für unterschiedliche lange Zeitintervalle mit hyperbarem Sauerstoff behandelt wurden (siehe Abb. 26).

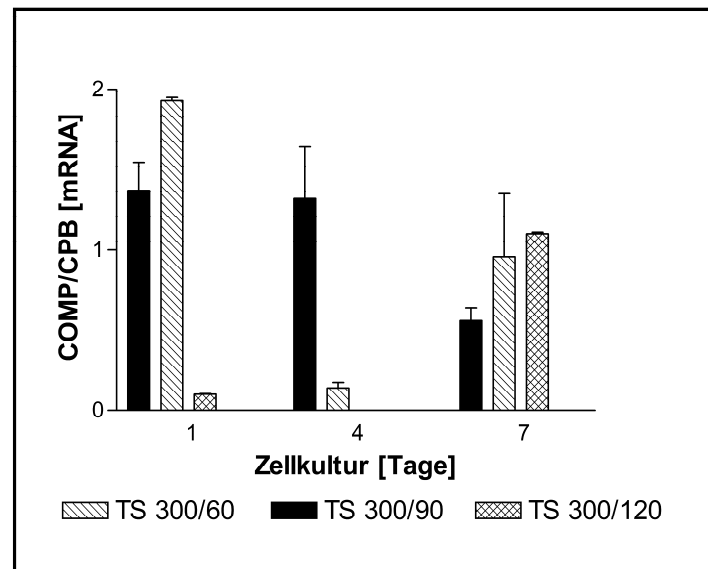


Abb. 26: Einfluss der Behandlungsdauer auf die Genexpression von COMP, TS 300/60 vs. TS 300/90 vs. TS 300/120

Es zeigte sich in der für jeweils 60 und 90 Minuten täglich behandelten Gruppe eine abnehmende Expression des COMP Genes im zeitlichen Verlauf. In der Gruppe, die für jeweils 120 Minuten behandelt wurde, konnte die Messung nach Behandlungstag 4 aufgrund eines technischen Fehlers nicht gewertet werden. Insgesamt lässt sich durch die Variation der Behandlungsdauer kein eindeutiger Trend in der Synthese von COMP darstellen.

4.4.1.3 Kollagen Typ I

Kollagen Typ I kommt bei Säugetieren und beim Menschen vor allem in Sehnen, Bändern und Knochen vor. Zusätzlich ist es Bestandteil des Faserknorpels, weshalb die Expression von Kollagen I mittels Light Cycler PCR untersucht wurde, um Aufschluss über eine mögliche Dedifferenzierung der Chondrozyten unter hyperbarer Sauerstofftherapie zu erhalten (siehe Abb. 27).

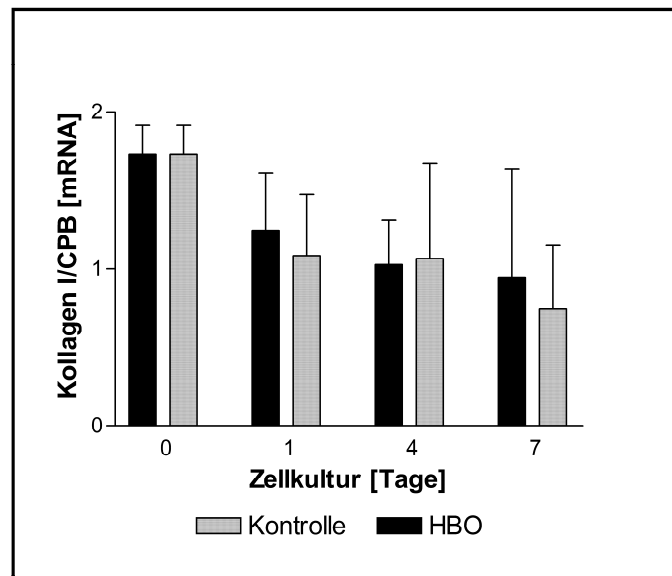


Abb. 27: Genexpression von Kollagen Typ I nach 7-tägiger HBO Behandlung TS 300/90

Zu beobachten ist eine relativ konstant bleibende Expression von Kollagen Typ I ab Versuchstag 1. Zwischen der behandelten und der Kontrollgruppe konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Ob die Höhe des applizierten Druckes Einfluss auf die Synthese von Kollagen Typ I hat sollte durch einen Vergleich der Gruppe TS 300/90 mit der Gruppe TS 200/90 untersucht werden (vgl. Abb. 28).

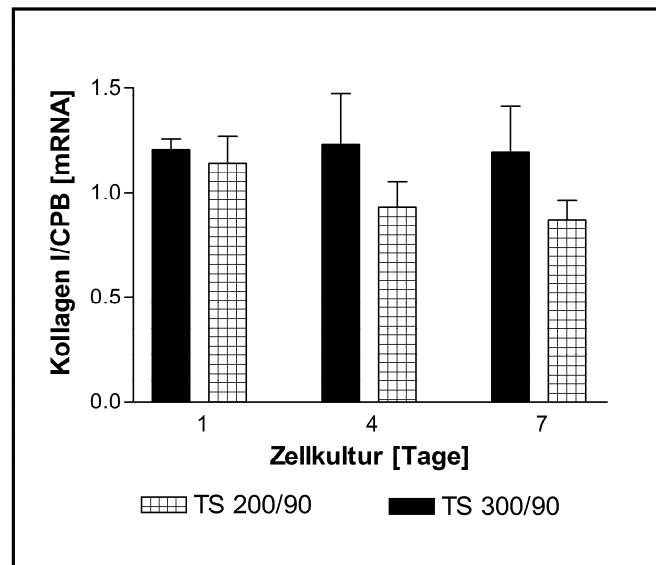


Abb. 28: Einfluss des applizierten Überdrucks auf die Genexpression von Kollagen Typ I; TS 200/90 vs. TS 300/90

Über den gesamten Versuchszeitraum zeigte die Zellgruppe, die mit dem Therapieschema TS 300/90 behandelt wurde, eine konstant hohe Genexpression von Kollagen I. Die Chondrozyten, die mit geringerem Überdruck behandelt wurden, exprimierten geringfügig weniger Kollagen I, wobei die Unterschiede zwischen beiden Gruppen keine Signifikanz besaßen. Zudem konnte festgestellt werden, dass sich die Kollagen I Synthese in der Gruppe TS 200/90 im zeitlichen Verlauf etwas verringerte.

Um den potentiellen Einfluss der Behandlungsdauer auf die Expression von Kollagen Typ I zu untersuchen, erfolgte eine Gegenüberstellung der behandelten Gruppen TS 300/60, TS 300/90 und TS 300/120 (Abb. 29).

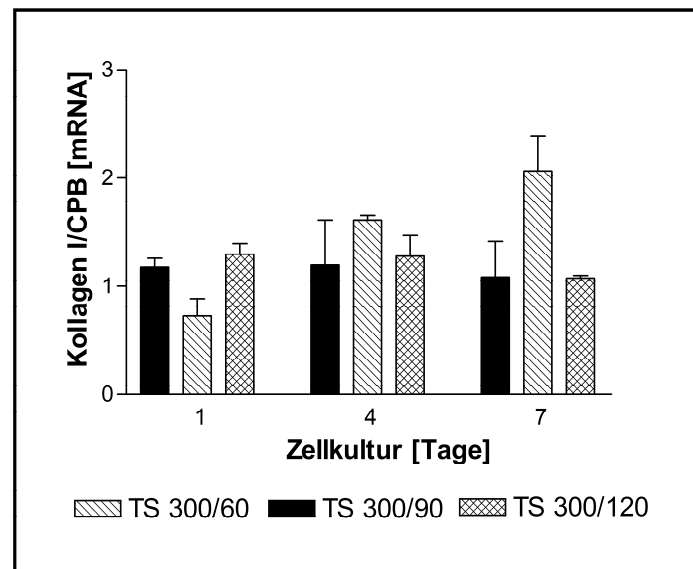


Abb. 29: Einfluss der Behandlungsdauer auf die Genexpression von Kollagen Typ I, TS 300/60 vs. TS 300/90 vs. TS 300/120

Die Gruppen, die für jeweils 90 und 120 Minuten täglich mit hyperbarem Sauerstoff behandelt wurden, zeigten über einen Untersuchungszeitraum von 7 Tagen eine gleichbleibende Syntheserate von Kollagen I wobei sich die beiden Gruppen nicht signifikant voneinander unterschieden. Die Chondrozyten, die für 60 Minuten täglich mit hyperbarem Sauerstoff behandelt wurden, zeigten hingegen eine Steigerung ihrer Kollagen I Synthese im zeitlichen Verlauf- jedoch ohne signifikante Unterschiede zu den beiden anderen Gruppen.

4.4.2 Einfluss der hyperbaren Oxygenierung auf die Synthese von Apoptosemarkern bei humanen Chondrozyten

Poly ADP-Ribose Polymerase-1 (PARP-1) und Caspase 3 wurden in der vorliegenden Arbeit als Apoptosemarker verwendet und ihre Expression mittels Light-Cycler PCR gemessen, um eine mögliche schädliche Wirkung der hyperbaren Sauerstofftherapie auf Chondrozyten und Fibroblasten zu detektieren.

4.4.2.1 CASPASE 3 (CASP)

Die Synthese des Apoptosemarkers Caspase 3 (CASP 3) sollte Aufschluss über einen möglichen toxischen Effekt der hyperbaren Sauerstofftherapie geben. Die Genexpression wurde nach Tag 1, 4 und 7 der hyperbaren Oxygenierung mit

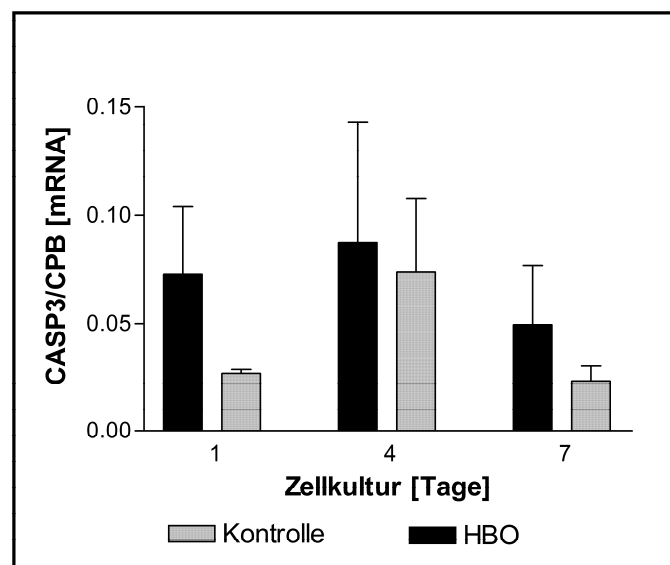


Abb. 30: Genexpression von Caspase 3 nach 7-tägiger HBO Behandlung mit TS 300/90; $p < 0,05$ nur an Messtag

1

Behandlungsschema TS 300/90 gemessen und mit der einer unbehandelten Kontrollgruppe verglichen (vgl. Abb. 30).

Bereits nach der ersten HBO-Sitzung zeigte sich in der behandelten Gruppe eine Hochregulierung des Caspase 3- Gens um mehr als 50% im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Dieser Trend ließ sich auch an den darauf folgenden Messtagen bestätigen, wobei die Unterschiede mit Ausnahme von Tag 1 nicht als signifikant gewertet werden konnten.

Im zeitlichen Verlauf blieb die Expression dieses Apoptosemarkers sowohl in der Kontrollgruppe, als auch in der HBO Gruppe auf annähernd konstantem Niveau.

Zudem wurden die HBO Gruppen, die auf unterschiedlich hohen Druckniveaus behandelt wurden, hinsichtlich der Genaktivität von CASP 3 verglichen (Abb. 31).

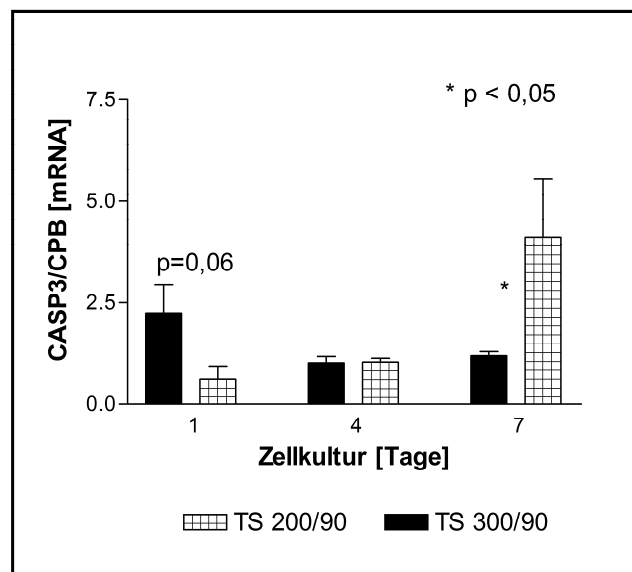


Abb. 31: Einfluss des applizierten Überdrucks auf die Genexpression von Caspase 3; TS 200/90 vs. TS 300/90

Nach der ersten hyperbaren Oxygenierung konnte in der Gruppe TS 200/90 eine etwas geringere CASP 3- Expression als in der Gruppe TS 300/90 gemessen werden, während nach der vierten Behandlung in beiden Gruppen vergleichbare Ergebnisse erzielt wurden. Nach der letzten Behandlung mit hyperbarer Sauerstofftherapie zeigten die Chondrozyten, die mit 1 bar Überdruck (TS 200/90) behandelt wurden, eine Hochregulierung des Caspase 3 Gens im Vergleich zur Gruppe TS 300/90 (2 bar Überdruck).

Ein potentieller Einfluss der Behandlungsdauer auf die Genexpression von Caspase 3 sollte durch Vergleich der drei Gruppen, die für unterschiedlich lange Zeitintervalle behandelt wurden, evaluiert werden (siehe Abb. 32).

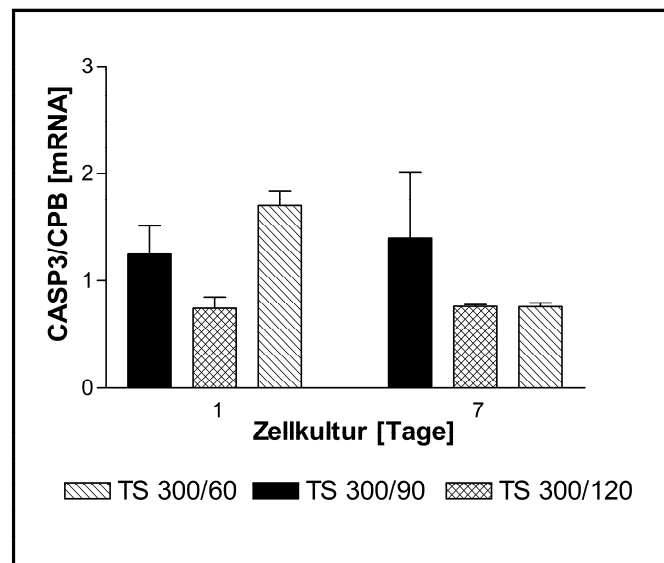


Abb. 32: Einfluss der Behandlungsdauer auf die Genexpression von Caspase 3; TS 300/60 vs. TS 300/90 vs. TS 300/120

An Messtag 7 wurde in der 90-Minuten Gruppe im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen eine Hochregulierung des Genes für Caspase 3 im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen beobachtet, während die Chondrozyten, die täglich jeweils für 60 und 120 Minuten behandelt wurden, über den gesamten Zeitverlauf eine relativ konstante Expression von CASP 3 zeigten. Signifikante Unterschiede konnten zwischen keinen Gruppen nachgewiesen werden.

4.4.2.2 POLY ADP-RIBOSE POLYMERASE (PARP)

Humane Chondrozyten wurden nach dem Versuchsprotokoll TS 300/90 mit hyperbarem Sauerstoff behandelt. Nach Tag 1, 4 und 7 der Behandlung erfolgte mittels light-cycler PCR die Messung der Expression von PARP-1. Gegenübergestellt wurde in Abbildung 33 die Genexpression der Kontrollgruppe und der HBO-Gruppe.

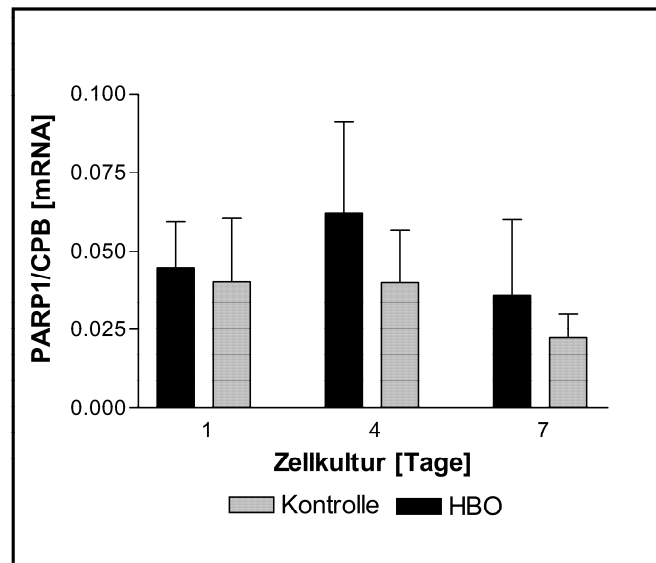


Abb. 33: Genexpression von Poly-ADP-Ribose-Polymerase 1 (PARP) nach 7-tägiger HBO Behandlung TS 300/90

An allen drei Messtagen konnte in der HBO-Gruppe eine vermehrte Kopienzahl von PARP-1 gemessen werden, die jedoch als statistisch nicht signifikant erschien. Der Apoptosemarker wurde in beiden Gruppen - auch im zeitlichen Verlauf - auf annähernd konstantem Niveau exprimiert.

Es wurde zudem untersucht, ob die Höhe des applizierten Überdruckes die Synthese des Apoptosemarkers PARP-1 beeinflusst. In Abbildung 34 wurde die Genexpression von PARP1 bei Chondrozyten, die an sieben aufeinander folgenden Tagen für jeweils 90 Minuten bei 2 bar bzw. 3 bar Überdruck inkubiert wurden, einander gegenübergestellt.

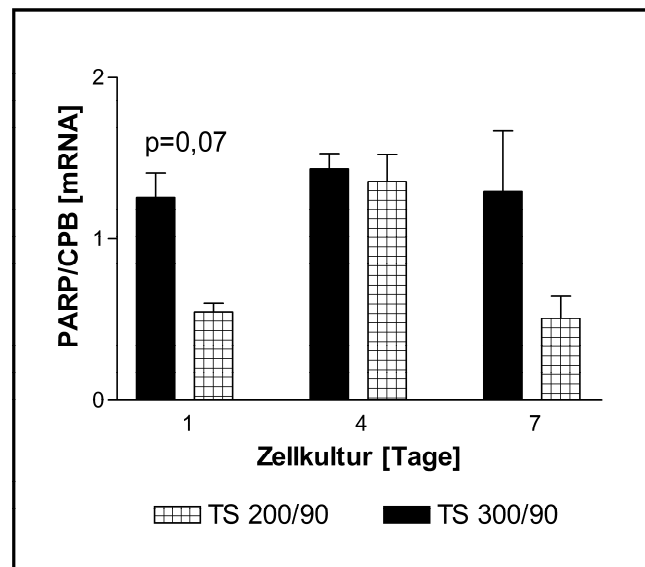


Abb. 34: Einfluss des applizierten Überdrucks auf die Genexpression von Poly-ADP-Ribose-Polymerase 1; TS 200/90 vs. TS 300/90

Im zeitlichen Verlauf blieb die Expression des Apoptosemarkers PARP 1 in beiden untersuchten Gruppen auf annähernd konstantem Niveau.

Die mit 3 bar Überdruck behandelten Chondrozyten zeigten hierbei jedoch im Vergleich bereits nach der ersten hyperbaren Oxygenierung eine gesteigerte Expression des Apoptosemarkers, welche auch an den darauf folgenden Messtagen beschrieben werden konnte.

Die Wirkung der Behandlungsdauer auf die Expression von PARP-1 konnte durch den Vergleich der unterschiedlich lang behandelten Chondrozyten dargestellt werden (Abb. 35).

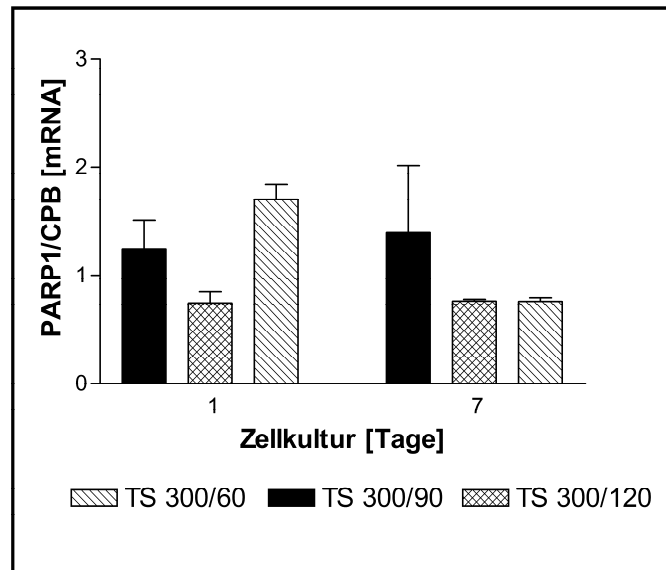


Abb. 35: Einfluss der Behandlungsdauer auf die Genexpression von Poly-ADP-Ribose-Polymerase 1; TS 300/60 vs. TS 300/90 vs. TS 300/120

Die Chondrozyten, welche nach dem Schema TS 300/90 und 300/120 behandelt wurden, zeigten über alle Messtagen eine relativ konstante Expression des Apoptosemarkers ohne signifikante Unterschiede. In der Chondrozytengruppe, die mit dem Schema TS 300/60 behandelt wurde, wurde an Tag 4 eine Hochregulierung von PARP beobachtet, was sich nach den folgenden Messung nicht bestätigte. Insgesamt fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression des untersuchten Apoptosemarkers hinsichtlich der Behandlungsdauer.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Applikation von hyperbarem Sauerstoff sowohl bei humanen Fibroblasten, als auch bei humanen Chondrozyten die Zellproliferation in Abhängigkeit von der Höhe des applizierten Druckes hemmt, wobei die Behandlungsdauer keinen Effekt auf die Zellproliferation aufweist.

Die Expression von chondrozytenspezifischen Markern (Kollagen Typ 2, Cartilage Oligomeric Matrix Proteine, Kollagen Typ 1) wird nicht wesentlich durch die Behandlung mit hyperbarem Sauerstoff beeinflusst, wohingegen die Expression der Apoptosemarker Caspase 3 und Poly-(ADP)-Ribose-Phosphorylase durch die Behandlung tendenziell hochreguliert erscheint. Die molekularbiologischen Ergebnisse lassen hierbei jedoch keine statistisch signifikanten Aussagen zu.

| TS 300/90 | TS 200/90 | TS 300/60 | TS 300/120 | HBO | Kontrolle | |
|-----------|-----------|-----------|------------|-----|-----------|--------------------|
| ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↔ | Proliferation |
| ↔ | ↔ | ↔ | ↔ | ↔ | ↔ | Chondrozytenmarker |
| ↑ | ↑ | ↔ | ↔ | ↑ | ↔ | Apoptosemarker |

5. Diskussion

5.1. Kultivierung humaner Chondrozyten

Um humane Chondrozyten für Forschungszwecke zu kultivieren, sind verschiedene Modelle etabliert. Grundsätzlich sind dabei zweidimensionale (Monolayerkultur) von dreidimensionalen Kultursystemen, wie z.B. Alginat- oder Agarosekulturen zu unterscheiden. Die Auswahl des eingesetzten Kultursystems sollte sich an der wissenschaftlichen Fragestellung orientieren, da sowohl den zwei- als auch den dreidimensionalen Systemen Vor- und Nachteile zugeschrieben werden, die es abzuwägen gilt.

Neben dem Vorteil der einfachen Handhabung kann durch den Einsatz einer Monolayerkultur eine rasche Proliferation der Chondrozyten erreicht werden, sodass in kurzer Zeit eine große Anzahl an Zellen kultiviert werden kann [1, 5, 42, 51]. Sollen die kultivierten Zellen bestimmten Stimuli ausgesetzt werden, so stellt die Monolayerkultur sicher, dass - durch das regelrechte Nebeneinander der am Boden der Kulturgefäße adhären Zellen - alle Zellen den gleichen Bedingungen ausgesetzt sind.

Andererseits gilt es zu bedenken, dass Chondrozyten in der Monolayerkultur schnell dedifferenzieren können [5, 19, 22, 38, 51, 88], was zum einen an einer Änderung des Phänotyps von sphärisch hin zum typisch spindelförmigen Aussehen der Fibroblasten zu erkennen ist und zum anderen mit einer Änderung der Genexpression einhergeht. Dedifferenzierte Chondrozyten synthetisieren vermehrt Kollagen Typ I, während die Synthese von Kollagen Typ II, Proteoglycan und Aggrecan gedrosselt wird.

Dreidimensionale Kultursysteme wie die Alginat-, oder Agarosekultur verhindern hingegen, dass Chondrozyten am Boden der Kulturgefäße adhären werden. Diese Techniken unterstützen die Aufrechterhaltung des differenzierten Phänotyps der Chondrozyten [1, 51] und fördern den Aufbau knorpelspezifischer Extrazellulärmatrix [86]. So können die Zellen für lange Zeiträume (bis zu neun Monate) kultiviert werden [86]. Zudem können bereits dedifferenzierte Chondrozyten durch Überführung in dreidimensionale Kultursysteme redifferenzieren [42, 51].

Der Nachteil dieses gut etablierten Kultivierungsverfahrens liegt im erheblichen Aufwand in der Herstellung der 3D-Kulturen. Zudem können humane Chondrozyten in dreidimensionaler Kultur nur sehr langsam proliferieren [43]. Die verwendeten Fremdstoffe können als Störfaktoren die Ergebnisse von biochemischen und molekularbiologischen Analysen beeinflussen [51].

Trotz der in der Literatur beschriebenen Nachteile, erschienen in der vorliegenden Arbeit die Vorteile des Monolayerverfahrens zu überwiegen, da das Ziel der Studie war, Erkenntnisse über das Proliferationsverhalten humaner Chondrozyten unter hyperbarer Sauerstofftherapie zu gewinnen. So erschien der Einsatz einer Kulturtechnik, die eine rasche Zellproliferation fördert, sinnvoll. Darüber hinaus sollte sichergestellt werden, dass alle untersuchten Zellen den gleichen Versuchsbedingungen ausgesetzt sind, was durch die Monolayerkultur eindeutig gesichert wird. Würden die Chondrozyten in 3D-Kulturen angezüchtet, so wären die Zellen in oberflächlichen Schichten eventuell anderen Versuchsbedingungen ausgesetzt, als die in tiefer gelegenen Schichten, was möglicherweise Einfluss auf die Resultate der Versuche hätte.

Die industriell bezogenen Chondrozyten befanden sich nach der Aussaat bereits in Passage 3. Ähnlich wie in der Literatur beschrieben [1, 42, 51], konnte bereits nach einer Woche in Monolayerkultur eine Veränderung der Morphologie der Zellen beobachtet werden. Zudem konnte mittels Real Time PCR nur sehr wenig Kollagen Typ II nachgewiesen werden, sodass eine stattgehabte Dedifferenzierung angenommen werden musste und die Zellen im weiteren Verlauf nicht mehr für die Druckversuche herangezogen wurden. Dahingehend stimmen unsere Ergebnisse mit denen von Huch und Niethard et al. [51, 75] überein, die beschreiben, dass Chondrozyten mit Zunahme der Passage zur Dedifferenzierung neigen.

Um Chondrozyten in einer möglichst geringen Zellpassage untersuchen zu können, wurden deshalb, wie bereits durch andere Forschungsgruppen in unserem Labor zuvor, Chondrozyten aus Spendergewebe isoliert.

Bereits nach einer relativ kurzen Kultivierungszeit von 3 Wochen im Monolayer konnten diese Chondrozyten ohne eine weitere Passagierung so expandiert werden, dass eine ausreichende Zellzahl für die Versuchsreihen zur Verfügung stand. Da ein positiver Nachweis von Kollagen Typ II erfolgt war und lichtmikroskopisch keine wesentliche Veränderung der Zellmorphologie zu erkennen war, konnte davon ausgegangen werden, dass keine relevante Dedifferenzierung der Chondrozyten

stattgefunden hatte und die Zellen für die Druckversuche herangezogen werden. Auch während der HBO Versuche zeigten diese Chondrozyten in Monolayerkultur – behandelt sowie unbehandelt- innerhalb einer Woche mehr als eine Verdoppelung ihrer Zellzahl.

5.2 Hyperbare Oxygenierung von Zellkulturen

Im klinischen Einsatz wird hyperbarer Sauerstoff nach festen Therapieschemata verabreicht. Nach einer meist 10-minütigen Kompressionsphase, in der die Patienten Raumlufatmen, folgt die Inspiration von reinem Sauerstoff auf einem definierten Überdruckniveau für einen vorgeschriebenen Zeitraum. Jede Pathologie wird hierbei mit einem eigens angepassten Therapieschema behandelt. Beispiele hierfür stellen unter anderem die *US Navy Treatment Table 6* bei Tauchunfällen, das *Problemwundenschema* (TS 240/90) bei ischämischen Prozessen und Weichteilnekrosen, oder das *Boerema Schema* (TS 300/90) bei Gasbrand oder Kohlenmonoxidvergiftungen [57] dar. Während der Isopressionsphase wird, mit Ausnahme des *Boerema Schemas*, die Inspiration von reinem Sauerstoff durch kurze Phasen von Raumlufatmung unterbrochen, was die Sauerstofftoxischen Effekte der Therapie reduzieren soll [18]. Die Zahl der Behandlungen ist im klinischen Alltag abhängig vom Therapieerfolg und kann beispielsweise bei der Behandlung von Problemwunden weit über 20 Behandlungen betragen.

In der vorliegenden Studie wurde ein Therapieschema angewendet, das leicht abgewandelt dem Boerema Schema entspricht. Auf die Applikation von Raumlufatmung während der Isopressionsphasen musste jedoch verzichtet werden, da die eingesetzte Druckkammer dies aus technischen Gründen nicht erlaubt. Mit der HAUX TESTCOM 200 wird der Überdruck über die Zufuhr von reinem Sauerstoff aufgebaut, wie dies auch bei Einpersonendruckkammern der Fall ist. Es gilt also bei der Interpretation der Ergebnisse zu bedenken, dass eine mögliche Reduktion sauerstofftoxischer Effekte durch intermittierende Raumlufatzufuhr nicht gewährleistet ist.

Da im klinischen Alltag – wie bereits dargelegt - aufgrund der unterschiedlichen Therapieindikationen keine feste Anzahl an Behandlungssitzungen definiert werden kann, wurde in der vorliegenden Arbeit die Behandlungsdauer auf sieben

Behandlungstage festgelegt, um die Rate an dedifferenzierten Chondrozyten möglichst gering zu halten.

5.3 Proliferation von Fibroblasten und Chondrozyten unter Hyperbarer Sauerstofftherapie

In der Literatur sind unterschiedliche Methoden beschrieben worden, mit deren Hilfe die Zellproliferation bestimmt werden kann. Grundsätzlich zu unterscheiden sind hierbei radioaktive Verfahren, wie der ^3H Thymidin Test und kolorimetrische Verfahren, wie der MTT-, XTT-, oder der WST-1 Proliferationsassay. Die zuletzt genannten Stoffe sind gelöste Tetrazoliumsalze, welche von mitochondrialen Dehydrogenasen zu Formazan gespalten werden. Der hierbei entstehende Farbumschlag der Lösung kann photometrisch gemessen werden und ist direkt proportional zur Anzahl proliferierender Zellen, da nur diese mitochondriale Aktivität aufweisen. MTT ist das älteste der erwähnten Tetrazoliumsalze, dessen Einsatz erstmals 1983 von Mosmann beschrieben wurde [70]. XTT und WST 1 sind modifizierte Tetrazoliumsalze, welche im Vergleich zu MTT zu wasserlöslichen Produkten gespalten werden [83]. Kolorimetrische Verfahren kommen in der Wissenschaft aktuell verstärkt zum Einsatz, da unter anderem ohne Radiaktivität gearbeitet werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Proliferation humaner Fibroblasten und Chondrozyten mit Hilfe des WST 1-Proliferationsassays bestimmt, da dieser nicht nur universell einsetzbar ist, sondern auch als besonders zeit- und kosteneffektiv gilt. WST 1- Reagenz steht als gebrauchsfertige Lösung zur Verfügung und kann sowohl bei adhärennten Zellen, als auch bei Zellsuspensionen angewendet werden. Da die Zellen vor der Proliferationsbestimmung nicht gewaschen und geerntet werden müssen, kann der komplette Versuchsaufbau in einem einzigen Kulturgefäß durchgeführt werden. Zudem kann der WST 1-Assay im Vergleich zum XTT- und MTT-Assay bereits nach einem Arbeitsschritt ausgewertet werden, was zeitsparend ist und das Auftreten von Fehlern bei der Handhabung minimiert. Mögliche Fehlerquellen, wie z.B. eine Veränderung des pH-Wertes oder der Glucosekonzentration im Medium und deren Einfluss auf die Reduktion des Salzes können jedoch die Ergebnisse beeinflussen [36, 65], weshalb durch regelmäßige

Medienwechsel die Versuchsbedingungen möglichst konstant gehalten werden sollten.

Mehrere Studien konnten bisher einen positiven Effekt der hyperbaren Sauerstofftherapie auf die Proliferation von Fibroblasten nachweisen [15, 21, 58, 60, 97], wobei ein optimales Druckniveau für die stimulierenden Effekte unerlässlich erscheint. Tompach et al. [97], Dimitrijevič et al. [21] und Kang et al. [58] zeigten, dass die hyperbare Sauerstofftherapie bei applizierten Drücken bis zu 2,5 bar absolut die Proliferation von Fibroblasten fördert, wohingegen mehr als 3 bar Überdruck die Proliferation eher zu hemmen scheint. Diese Erkenntnisse decken sich genauso mit den Ergebnissen unserer eigenen Vorarbeiten, wie auch denen von Kang et al. [58], wo initial ein Abfall in der Anzahl vitaler Zellen nach der ersten hyperbaren Oxygenierung beobachtet wurde. Honda et al. [48] konnten hingegen durch ihre *in vitro* Versuch mit Fibroblasten zeigen, dass diese Zellen auf die HBO Behandlung mit sehr hohen Überdrücken (bis zu 75 bar) mit einer verminderten Zellteilung reagieren, wohingegen die Behandlung mit Stickstoff unter Überdruck keinen negativen Effekt aufwies. Roberts und Mitarbeiter [82] konnten durch den Einsatz der HBO zwar eine gesteigerte Glykosaminoglykansynthese beschreiben, die Proliferation humaner Fibroblasten nahm allerdings nach der Therapie um 7% ab.

Entsprechend dieser Ergebnisse, konnte auch in der vorliegenden Arbeit auf keinem der applizierten Druckniveaus eine Steigerung der Zellproliferation humaner Fibroblasten gezeigt werden. Die Inhibition der Proliferation, die beobachtet wurde, könnte wohl am ehesten auf mögliche sauerstofftoxische Effekte zurückgeführt werden. Honda [48] konnte eindeutig belegen, dass hyperbarer Stickstoff (auch auf sehr hohen Niveaus von bis zu 75 bar) keine schädigende Wirkung auf die Proliferation von Fibroblasten hat und führte den negativen Einfluss der HBO auf dessen sauerstofftoxische Wirkung zurück.

Während Tompach und Mitarbeiter [97] postulierten, dass Fibroblasten erst ab einer Behandlungsdauer von 120 Minuten HBO täglich (2,4 bar Überdruck) mit einer gesteigerten Proliferation reagieren, zeigte die Behandlungsdauer in der vorliegenden Arbeit, in der die Zellen allerdings täglich einem höheren Druck (3 bar) ausgesetzt waren, keinen Einfluss auf die Proliferation der Fibroblasten.

Der Einfluss der hyperbaren Oxygenierung auf das Wachstum von Zellen, die an der Wundheilung beteiligt sind, ist bereits relativ gut untersucht, die Wirkung dieser Therapieform auf bradytrophes Gewebe, wie Gelenkknorpel, ist jedoch bisher wenig

beschrieben. Speziell auf zellulärer Ebene ist die Wirkungsweise dieser Therapie hier noch nahezu unbekannt.

Calderwood et al. [12], Chen et al. [16] und Yuan et al. [109, 110] konnten in ihren Publikationen bereits positive Effekte der hyperbaren Sauerstofftherapie auf Knorpelgewebe *in vivo* nachweisen. Chen und Yuan konnten durch die Behandlung mit hyperbarem Sauerstoff (jeweils bei 2,5 atm für 120 Minuten) eine Verbesserung der Defektheilung bei iatrogen induzierten „full-thickness“ Defekten am Gelenkknorpel von Hasen beobachten. Welchen Effekt diese Therapieform jedoch auf die Proliferation der einzigen zellulären Bestandteile des Knorpels, die Chondrozyten, hat, ist bisher nur einmalig von Yuan und Mitarbeitern untersucht worden [109]. Chondrozyten wurden aus dem Gelenkknorpel von Hasen isoliert, im Monolayer kultiviert und einmalig mit hyperbarem Sauerstoff behandelt (120 Minuten bei 2,5 atm). Mittels eines MTT Assays wurde die Proliferation der Chondrozyten 48 Stunden nach der Behandlung bestimmt. Zudem wurde mit Hilfe der FACS (fluorescence activated cell sorter) Analyse die Anzahl an Zellen analysiert, die sich in der S-Phase des Zellzyklus befinden. Sowohl die absolute Zellzahl, als auch die Anzahl an Zellen in der S-Phase war in der HBO Gruppe 48 Stunden nach einmaliger hyperbarer Oxygenierung im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht.

In der vorliegenden Arbeit konnte hingegen zeitnah nach der ersten hyperbaren Oxygenierung der humanen Chondrozyten (90 Minuten bei 3 bar) kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Proliferation den behandelten und unbehandelten Zellen gesehen werden. Bei kontinuierlicher täglicher Behandlung zeigte sich nach dem dritten Tag im Vergleich zu den unbehandelten Chondrozyten zudem eine verzögerte Proliferation in der Gruppe von Chondrozyten, die für 7 Tage mit dem Therapieschema TS 300/90 behandelt wurden. Verglichen mit den Ergebnissen der Proliferationsassays bei humanen Fibroblasten und den entsprechenden in der Literatur beschriebenen Ergebnissen, ist anzunehmen, dass bei einer Applikation von 3 bar Überdruck und mehr die negativen Effekte der Sauerstofftoxizität auch die Proliferation humaner Chondrozyten hemmen. Auch durch die tägliche Applikation von hyperbarem Sauerstoff mit einem geringeren Druckniveau (2 bar) konnten die proliferationssteigernden Effekte, die von Yuan und Mitarbeitern [109] beschrieben wurden, nicht reproduziert werden: an den Messtagen 1, 3 und 7 konnten keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl an vitalen Chondrozyten zwischen der HBO

Gruppe und der Kontrollgruppe beobachtet werden. Auch die Variation der täglichen Behandlungsdauer zeigte keinen Effekt auf die Proliferation der humanen Chondrozyten.

In der vorliegenden Studie wurde die Zellproliferation direkt (30 Minuten) nach der HBO Behandlung gemessen, wohingegen Yuan et al. die Proliferation der Chondrozyten erst nach einer Ruhephase von 48 Stunden bestimmten. Eine Erklärungsmöglichkeit der kontroversen Ergebnisse könnte sein, dass innerhalb dieser 48 Stunden potentiell schädigende Effekte der Therapie kompensiert werden, d.h. dass Schutzmechanismen gegen oxidativen Stress einsetzen können bzw. Reparaturvorgänge in Kraft treten.

Zudem bleibt zu bedenken, dass Zellen verschiedener Spezies nicht direkt miteinander verglichen werden sollten, da tierische Zellen sich allein in ihrem Kulturverhalten anders präsentieren könnten als humane Zellen (vgl. Nierthard et al [75]).

5.4 Geninduktion durch hyperbare Sauerstofftherapie

Die *Real time PCR* ist eine beliebte Methode, um schnell und mit relativ geringem Aufwand die Expression bestimmter Gene als quantitative Echtzeitanalyse zu untersuchen. Im Vergleich zur „herkömmlichen“ PCR (polymerase chain reaction) ist dieses Verfahren weniger störanfällig, d.h. es kommt zu weniger unspezifischen Amplifikationen. Zudem kann durch die Einführung fluoreszierender Farbstoffe auf den Einsatz von Radioaktivität oder gesundheitsgefährdender Stoffe wie Ethidiumbromid verzichtet werden. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass bereits geringe Mengen eingesetzter RNA valide Ergebnisse liefern [33, 45] [100]. Mit Hilfe der *Real time PCR* ist es möglich, absolute und relative Quantifizierungen durchzuführen, d.h. es kann sowohl bestimmt werden, wie viele Kopien einer bestimmten RNA-Sequenz sich in der zu untersuchenden Probe befinden, als auch ein quantitativer Vergleich zwischen zwei unterschiedlichen Proben durchgeführt werden [100]. Diese Vorteile der *Real time PCR* im Vergleich zu älteren Verfahren wurden auch in der vorliegenden Studie genutzt.

Um eine relative Quantifizierung durchzuführen, ist es nötig, die Probe zu normieren, d.h. mit einer endogenen Kontrolle zu vergleichen. Diese endogene Kontrolle, auch Haushaltsgen (engl. *housekeeping gene*) genannt, darf durch die

Versuchsbedingungen nicht beeinflussbar sein und sollte bei allen PCR Schritten die gleiche Kinetik wie das Zielgen aufweisen [26, 39, 100]. In der vorliegenden Arbeit wurde Cyclophilin B als Haushaltsgen herangezogen, ein Gen, das –wie auch GAPDH oder β -Aktin- ubiquitär in Zellen und Geweben vorkommt und in der Literatur als passendes Referenzgen gehandelt wird. Als typische Marker für hyalinen Knorpel wurden Kollagen Typ II und Cartilage Oligomeric Matrix Proteine (COMP) als frühe Chondrozytenmarker [44] untersucht. Kollagen Typ I, welches primär im Faserknorpel vorkommt, wurde als Indikator einer potentiellen Dedifferenzierung der Chondrozyten herangezogen. Als Apoptosemarker wurden Caspase 3 und Poly ADP Ribose Polymerase (PARP) eingesetzt. Caspase 3 stellt ein zentrales Protein bei der Induktion von Apoptose dar. Sie kann sowohl über den extrinsischen (via Todesrezeptoren und Caspase 8), als auch über den intrinsischen Signalübertragungsweg (mitochondrial) aktiviert werden [77, 101]. Poly-ADP-Ribose Polymerase 1 (PARP1) gilt als Indikator für stattgehabte Einzelstrangbrüche in der DNA oder deren Reparaturvorgänge [11, 50, 105].

In der einzigen *in vitro* Studie, die bisher den Effekt der hyperbaren Sauerstofftherapie auf Chondrozyten untersucht hat, wurde zwar die Zellproliferation untersucht, nicht aber der Einfluss dieser Therapieform auf das Genexpressionsmuster der Zellen. In der vorliegenden Arbeit sollte dies deshalb, neben den Proliferationsuntersuchungen, die Hauptfragestellung sein.

Kollagen Typ II - als typischer Chondrozytenmarker- erschien bei Chondrozyten nach der ersten Behandlung mit TS 300/90 im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe hochreguliert. Auch im Vergleich zu den Zellen, die nach dem TS 200/90- Schema behandelt wurden waren nach der ersten hyperbaren Oxygenierung deutlich mehr Kopien an Kollagen Typ II nachweisbar. Im Verlauf der folgenden Behandlungstage konnten dieses Ergebnis jedoch nicht reproduziert werden, da weder zwischen der Kontrollgruppe und TS 300/90, noch zwischen der TS 200/90- und TS 300/90-Gruppe signifikante Unterschiede in der Expression von Kollagen Typ II gezeigt werden konnten. Zudem fiel in allen Gruppen- behandelt wie unbehandelt- während einer einwöchigen Kulturzeit eine eindeutige Down-Regulierung des Kollagen II Gens auf.

Die Genexpression von COMP, dem zweiten untersuchten Chondrozytenmarker zeigte ein ähnliches Bild wie die von Kollagen Typ II. In der behandelten Gruppen (TS 300/90) konnten im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe tendenziell

mehr Kopien/RNA nachgewiesen werden und auch in der TS 300/90 Gruppe zeigte sich in Korrelation zur TS 200/90 Gruppe eine scheinbar vermehrte COMP-Expression, wobei nur an Messtag 1 signifikante Unterschiede messbar waren. In allen untersuchten Gruppen, d.h. auch in den unbehandelten kam es im Laufe einer Woche zu einer verminderten Expression von COMP.

Kollagen Typ I wurde in allen untersuchten Gruppen über den gesamten Versuchszeitsraum auf annähernd konstantem Niveau exprimiert, so dass postuliert werden kann, dass die Synthese durch die hyperbare Sauerstofftherapie nicht beeinflusst wird.

Auch scheint die Dauer der einzelnen HBO Sitzungen keinen Einfluss auf die Expression chondrozytenspezifischer Marker zu haben.

Diese Beobachtungen legen nahe, dass die Applikation von hyperbarem Sauerstoff tendenziell nicht zur Dedifferenzierung der Chondrozyten führt, sondern eher die Expression von chondrozytenspezifischen Markern fördert. Die verminderte Expression von Chondrozytenmarkern (Kollagen Typ II und COMP), die im zeitlichen Verlauf von einer Woche in allen Gruppen beobachtet wurde, könnte in einer möglichen beginnenden Dedifferenzierung aufgrund des Kultursystems (Monolayerkultur) begründet sein. Diese These wird durch die Forschungsergebnisse von Niethard et al. [75] unterstützt, die im Rahmen von Versuchen an Chondrozyten in 2D-Kultur ebenfalls eine Verminderung der Kollagen Typ II Expression beobachten konnten.

Bei der Behandlung mit hyperbarem Sauerstoff gilt es neben den erwünschten positiven Effekten auch mögliche negative Auswirkungen zu bedenken. So ist lange bekannt, dass durch den im Rahmen der Behandlung auftretenden oxidativen Stress reaktive Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species*, *ROS*) freigesetzt werden [46, 91, 93, 94]. Zu der Gruppe der *ROS* zählt man freie Radikale wie das Hyperoxidanion ($O_2^{\cdot -}$) und das Hydroxylradikal (OH^{\cdot}), aber auch stabile molekulare Sauerstoffderivate, wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Zudem entstehen durch das Zusammentreffen von *ROS* und Stickstoffmonoxid (NO^{\cdot}) sogenannte reaktive Stickstoffspezies (*RNS*) [94]. Zwar produzieren alle Zellen des Organismus *ROS* physiologisch als metabolische Nebenprodukte bei der Zellatmung und diese tragen zudem wichtige Funktionen als Botenstoffe, jedoch kann eine Überproduktion zu drastischen Schäden, wie Strangbrüchen oder Basenveränderungen in der DNA führen [91]. Dennog et al. [20], sowie Speit und Mitarbeiter [90] konnten mittels

Comet Assay DNS Schäden an humanen Leukozyten durch eine einmalige Behandlung mit hyperbarem Sauerstoff *in vivo* nachweisen. Nach mehrfacher Behandlung konnte dieser Effekt nicht mehr beobachtet werden, was darauf schließen lässt, dass der menschliche Organismus effektive Reparaturmechanismen [90] gegen oxidative Schäden besitzt.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch eine 7-tägige Behandlung mit hyperbarem Sauerstoff (TS 300/90) eine Hochregulierung der Gene für Caspase3 und PARP1 bei humanen Chondrozyten nachgewiesen werden, wenn auch der Unterschied zur unbehandelten Kontrollgruppe nicht als signifikant gewertet werden konnte. Zudem zeigte sich ein dosisabhängiger Effekt in der Induktion von Apoptosemarkern. Chondrozyten, die für 7 Tage mit dem Therapieschema TS 200/90 behandelt wurden, zeigten eine weniger starke Genexpression von CASP3 und PARP1 als Zellen, die mit dem Therapieschema TS 300/90 behandelt wurden, sodass die Frage zu stellen ist, ob ein vermehrter Druck zusätzliche Zellschäden verursacht. Unterstützt wird diese These durch die Arbeit von Weber et al. [101], welche nach einer einmaligen Behandlung mit 3 bar Überdruck eine deutliche Hochregulierung der Caspase3 Aktivität bei behandelten humanen T-Zellen *in vitro* beschreibt. Während Hyperoxie allein sowie Normoxie bei 3 bar Überdruck in dieser Studie keinen Effekt auf die Apoptose der Zellen zeigten, wurde bei 2 bar Überdruck ein nur sehr geringer Anstieg der Caspase3 Aktivität gemessen.

Auch Rothfuß und Mitarbeiter [84, 85] konnten diesen druckabhängigen Effekt in ihren *in vitro* Studien zeigen. Sie beobachteten, dass die Erhöhung des applizierten Überdruckes auf 3 bar Gesamtdruck zu einer gesteigerten DNS Schädigung in verschiedenen Säugetierzellen führt, was sie durch eine druckabhängige Erhöhung der ROS erklärt sehen. Zudem beobachteten sie eine vermehrte Zellschädigung durch eine Verlängerung der Behandlungsdauer mit HBO. Diese Beobachtung konnte in der hier vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden, da die Behandlungsdauer in unseren Versuchen keine Auswirkung auf die Genexpression von Apoptosemarkern hatte.

Die Zusammenschau der Ergebnisse der genannten Studien und der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass die hyperbare Sauerstofftherapie oxidativen Stress verursacht. Da bei vereinzelten Indikationen *in vivo* bereits mehrfach der Nutzen dieser Therapieform belegt wurde, ohne den genauen Wirkmechanismus erklären zu können und in der Klinik nur sehr selten negative Effekte auftreten, ist

anzunehmen, dass der menschliche Organismus über sehr effektive Schutzmechanismen und gute Reparaturmechanismen verfügen muss. Im Gegensatz hierzu erscheinen Zellen *in vitro* viel anfälliger gegen oxidativen Stress [101] zu sein, was am Fehlen dieser protektiven Effekte in der Zellkultur liegen könnte.

5.5 Eignen sich humane Chondrozyten als Zielzellen für die Hyperbare Sauerstofftherapie?

Da Chondrozyten einerseits sensibel auf Druck [24, 72, 102] und andererseits auf das zur Verfügung stehende Sauerstoffangebot [37, 64, 108] zu sein scheinen, könnten diese Zellen auch für die Behandlung mit hyperbarem Sauerstoff empfänglich sein. *In vivo* Versuche am Tiermodell [16, 109, 110] zeigen initiale Erfolge der hyperbaren Oxygenierung als adjuvante Therapie von artifiziell induzierten Defekten in Gelenkknorpel. In den genannten Studien wurden an Hasen sog. „Full Thickness“ Defekte, d.h. Knorpeldefekte, die bis in die subchondrale, vaskularisierte Zone reichen, mit hyperbarem Sauerstoff behandelt. Mittels histologischen Scores konnte in allen drei Studien Reparaturgewebe nachgewiesen werden, welches dem nativen hyalinen Knorpel sehr nahe kommt. Nur Yuan und Mitarbeiter [109] untersuchten dabei auch die Wirkung dieser Therapieform auf zellulärer Ebene. In ihrer Studie zeigte sich nach einer einmaligen Behandlung mit hyperbarem Sauerstoff eine gesteigerte Proliferation der Chondrozyten. Dieses Ergebnis konnte in der hier vorliegenden Arbeit nicht reproduziert werden. Es stellt sich die Frage, ob die *in vivo* beobachteten positiven Effekte als direkte Wirkung auf die Chondrozyten zu sehen sind, oder ob nicht vielmehr andere Zellen an der beschriebenen Defektheilung beteiligt sind. Da in allen drei oben genannten Studien Defekte untersucht wurden, die bis in die subchondralen vaskularisierten Bereiche reichten, könnten möglicherweise auch mesenchymale Stammzellen durch die Behandlung mit hyperbarem Sauerstoff rekrutiert worden und ursächlich an der beobachteten Defektheilung beteiligt sein. Thom et al. [95] zeigten in ihrer Studie, dass nach mehrfacher Behandlung mit hyperbarem Sauerstoff bei gesunden Probanden vermehrt Knochenmarksstammzellen im peripheren Blut nachgewiesen werden konnten. Die Mobilisation der MSC erfolgt demzufolge auf einem Stickstoffmonoxid (*NO) abhängigem Weg. Auch andere Arbeitsgruppen konnten

positive Effekte der hyperbaren Sauerstofftherapie auf Stammzellen nachweisen (Thom et al. [96], Khan et al. [59], Milovanova et al. [68]). Da diese Zellen unter anderem die Fähigkeit zur chondrogen Differenzierung besitzen, gilt ihr Einsatz bei der Behandlung von osteochondralen Defekten schon lange als sehr vielversprechend (vgl. Caterson EJ et al. [13, 14]). Durch eine adjuvante Behandlung der MSC mit hyperbarem Sauerstoff könnte es möglich sein, deren Differenzierung positiv zu beeinflussen. Weitergehende Forschung auf diesem Gebiet wird Ziel weiterer Studien –auch in unserem Labor- sein.

6. Zusammenfassung

Unter dem Begriff Hyperbare Sauerstofftherapie (HBO) versteht man die Applikation von reinem Sauerstoff unter höherem Druck als dem Atmosphärendruck. HBO findet im klinischen Alltag vor allem Anwendung bei der Behandlung von Tauchunfällen, Kohlenmonoxidvergiftungen und Problemwunden. Eine Vielzahl an möglichen neuen Indikationen für diese Therapieform steht aktuell im Fokus der Wissenschaft.

So ist die Behandlung von Knorpeldefekten – welche für die orthopädische Chirurgie schon lange eine große Herausforderung darstellt - mit Hilfe der Hyperbaren Oxygenierung momentan Gegenstand diverser Studien. Durch *in vivo* Studien am Tiermodell konnten bereits positive Effekte der HBO auf die Defektheilung von artifiziell induzierten Knorpelschäden gezeigt werden, was einen vielversprechenden Ansatz in der adjuvanten Behandlung von Knorpeldefekten darstellen könnte. Die Effekte des hyperbaren Sauerstoffs auf die zellulären Bestandteile des Knorpelgewebes sind dabei noch sehr wenig erforscht. Chondrozyten, die einzigen zellulären Bestandteile des bradytrophen Knorpelgewebes, reagieren nachweislich sehr empfindlich auf die Applikation von Druck. Zudem können sie durch eine Veränderung des Sauerstoffangebotes in ihrem Stoffwechsel beeinflusst werden.

Ziel dieser Arbeit ist es deshalb, die Effekte der Hyperbaren Sauerstofftherapie auf das Proliferationsverhalten und das Genexpressionsmuster humaner Chondrozyten zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurden die Zellen für sieben aufeinanderfolgende Tage mit dem Therapieschema TS 300/90 (3 bar Überdruck, Behandlungsdauer 90 Minuten) behandelt und mit einer unbehandelten Kontrollgruppe verglichen. Durch Variation des applizierten Überdrucks (TS 200/90 vs. TS 300/90) und der Behandlungsdauer (TS 300/60 vs. TS 300/90 vs. TS 300/120) sollten mögliche dosisabhängige Einflüsse detektiert werden. Die Zellproliferation wurde mittels WST-1 Assay und die Expression von knorpelspezifischen Markern (Kollagen Typ I und Typ II, COMP) und Apoptosemarkern (Caspase 3, PARP1) mit Hilfe der Real Time PCR bestimmt.

Kernaussage der vorliegenden Arbeit ist, dass durch die Applikation von 2 bar Überdruck (TS 200/90) die Proliferation humaner Chondrozyten nicht signifikant beeinflusst wird und eine Behandlung mit mehr als 3 bar Überdruck (TS 300/90) die

Proliferation humaner Chondrozyten sogar deutlich limitiert. Die Dauer der HBO Sitzungen spielt dabei keine Rolle.

Alle gemessenen chondrozytenspezifische Marker wurden durch die Behandlung mit hyperbarem Sauerstoff nicht negativ beeinflusst, wohingegen die Expression der Apoptosemarker durch die hyperbare Oxygenierung geringfügig hochreguliert wird.

Diese (dosisabhängigen) negativen Effekte auf die Zellproliferation scheinen in Korrelation mit der Genexpression die Folge einer erhöhten Sauerstofftoxizität durch ROS (reaktive Sauerstoffspezies) zu sein.

Durch die Ergebnisse dieser Studie können die *in vivo* beobachteten positiven Effekte der HBO auf geschädigten Knorpel auf zellulärer Ebene weder bestätigt noch erklärt werden. Ziel weiterer Forschung sollte es deshalb sein, mögliche positive Effekte dieser Therapie auf andere an der Defektheilung beteiligte Zellen, wie MSC (mesenchymale Stammzellen) zu untersuchen.

7. Literaturverzeichnis

- [1] Adolphe M, Benoit B. [Human articular chondrocyte culture. Value in pharmacotoxicology]. *Ann Pharm Fr* 1994;52:177-83.
- [2] Ahmed TA, Hincke MT. Strategies for articular cartilage lesion repair and functional restoration. *Tissue Eng Part B Rev* 2010;16:305-29.
- [3] Augello A, Kurth TB, De BC. Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. *Eur Cell Mater* 2010;20:121-33.
- [4] Bedi A, Feeley BT, Williams RJ, III. Management of articular cartilage defects of the knee. *J Bone Joint Surg Am* 2010;92:994-1009.
- [5] Binette F, McQuaid DP, Haudenschild DR, Yaeger PC, McPherson JM, Tubo R. Expression of a stable articular cartilage phenotype without evidence of hypertrophy by adult human articular chondrocytes in vitro. *J Orthop Res* 1998;16:207-16.
- [6] Bobic V. [Autologous osteo-chondral grafts in the management of articular cartilage lesions]. *Orthopade* 1999;28:19-25.
- [7] BOEREMA I, MEYNE NG, BRUMMELKAMP WH, BOUMA S, MENSCH MH, KAMERMANS F, STERN HM, van AALD. [Life without blood.]. *Ned Tijdschr Geneesk* 1960;104:949-54.
- [8] Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instr Course Lect* 1998;47:487-504.
- [9] Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect* 1998;47:477-86.
- [10] Buckwalter JA, Mankin HJ, Grodzinsky AJ. Articular cartilage and osteoarthritis. *Instr Course Lect* 2005;54:465-80.
- [11] Burkle A. Poly(ADP-ribose). The most elaborate metabolite of NAD⁺. *FEBS J* 2005;272:4576-89.
- [12] Calderwood JW. The effect of hyperbaric oxygen on the transplantation of epiphyseal growth cartilage in the rabbit. *J Bone Joint Surg Br* 1974;56-B:753-9.
- [13] Caterson EJ, Nesti LJ, Albert T, Danielson K, Tuan R. Application of mesenchymal stem cells in the regeneration of musculoskeletal tissues. *MedGenMed* 2001:E1.
- [14] Caterson EJ, Nesti LJ, Li WJ, Danielson KG, Albert TJ, Vaccaro AR, Tuan RS. Three-dimensional cartilage formation by bone marrow-derived cells

- seeded in polylactide/alginate amalgam. *J Biomed Mater Res* 2001;57:394-403.
- [15] Chan YS, Chen AC, Yuan LJ, Lin SS, Yang CY, Lee MS, Ueng SW. Effects of hyperbaric oxygen and platelet derived growth factor on medial collateral ligament fibroblasts. *Undersea Hyperb Med* 2007;34:181-90.
- [16] Chen AC, Lee MS, Lin SS, Pan LC, Ueng SW. Augmentation of osteochondral repair with hyperbaric oxygenation: a rabbit study. *J Orthop Surg Res* 2010;5:91.
- [17] Chew HE, Hanson GC, Slack WK. Hyperbaric oxygenation. *Br J Dis Chest* 1969;63:113-39.
- [18] Cianci P, Slade JB, Jr. Delayed treatment of decompression sickness with short, no-air-break tables: review of 140 cases. *Aviat Space Environ Med* 2006;77:1003-8.
- [19] Darling EM, Pritchett PE, Evans BA, Superfine R, Zauscher S, Guilak F. Mechanical properties and gene expression of chondrocytes on micropatterned substrates following dedifferentiation in monolayer. *Cell Mol Bioeng* 2009;2:395-404.
- [20] Dennog C, Hartmann A, Frey G, Speit G. Detection of DNA damage after hyperbaric oxygen (HBO) therapy. *Mutagenesis* 1996;11:605-9.
- [21] Dimitrijevic SD, Paranjape S, Wilson JR, Gracy RW, Mills JG. Effect of hyperbaric oxygen on human skin cells in culture and in human dermal and skin equivalents. *Wound Repair Regen* 1999;7:53-64.
- [22] Domm C, Fay J, Schunke M, Kurz B. [Redifferentiation of dedifferentiated joint cartilage cells in alginate culture. Effect of intermittent hydrostatic pressure and low oxygen partial pressure]. *Orthopade* 2000;29:91-9.
- [23] Eckstein F, Lemberger B, Gratzke C, Hudelmaier M, Glaser C, Englmeier KH, Reiser M. In vivo cartilage deformation after different types of activity and its dependence on physical training status. *Ann Rheum Dis* 2005;64:291-5.
- [24] Elder BD, Athanasiou KA. Hydrostatic pressure in articular cartilage tissue engineering: from chondrocytes to tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 2009;15:43-53.
- [25] Eyre D. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res* 2002;4:30-5.
- [26] Foldager CB, Munir S, Ulrik-Vinther M, Soballe K, Bunger C, Lind M. Validation of suitable house keeping genes for hypoxia-cultured human chondrocytes. *BMC Mol Biol* 2009;10:94.
- [27] Foster JH. Hyperbaric oxygen therapy: contraindications and complications. *J Oral Maxillofac Surg* 1992;50:1081-6.

-
- [28] Frey G, Lampl L, Radermacher P, Bock KH. [Hyperbaric oxygenation. An area for the anesthetist?]. *Anaesthesist* 1998;47:269-89.
- [29] Fritz J, Gaissmaier C, Schewe B, Weise K. [Cartilage repair in the knee joint]. *Unfallchirurg* 2006;109:563-74.
- [30] Furukawa T, Eyre DR, Koide S, Glimcher MJ. Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee. *J Bone Joint Surg Am* 1980;62:79-89.
- [31] Gabb G, Robin ED. Hyperbaric oxygen. A therapy in search of diseases. *Chest* 1987;92:1074-82.
- [32] Garnero P, Rousseau JC, Delmas PD. Molecular basis and clinical use of biochemical markers of bone, cartilage, and synovium in joint diseases. *Arthritis Rheum* 2000;43:953-68.
- [33] Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 1996;6:995-1001.
- [34] Goldring MB. Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 2012;4:269-85.
- [35] Goldring MB, Marcu KB. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther* 2009;11:224.
- [36] Goodwin CJ, Holt SJ, Downes S, Marshall NJ. Microculture tetrazolium assays: a comparison between two new tetrazolium salts, XTT and MTS. *J Immunol Methods* 1995;179:95-103.
- [37] Grimshaw MJ, Mason RM. Bovine articular chondrocyte function in vitro depends upon oxygen tension. *Osteoarthritis Cartilage* 2000;8:386-92.
- [38] Grundmann K, Zimmermann B, Barrach HJ, Merker HJ. Behaviour of epiphyseal mouse chondrocyte populations in monolayer culture. Morphological and immunohistochemical studies. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 1980;389:167-87.
- [39] Guenin S, Mauriat M, Pelloux J, Van WO, Bellini C, Gutierrez L. Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. *J Exp Bot* 2009;60:487-93.
- [40] Guilak F, Jones WR, Ting-Beall HP, Lee GM. The deformation behavior and mechanical properties of chondrocytes in articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 1999;7:59-70.
- [41] Hall FM, Wyshak G. Thickness of articular cartilage in the normal knee. *J Bone Joint Surg Am* 1980;62:408-13.
- [42] Harrison PE, Ashton IK, Johnson WE, Turner SL, Richardson JB, Ashton BA. The in vitro growth of human chondrocytes. *Cell Tissue Bank* 2000;1:255-60.

-
- [43] Hauselmann HJ, Aydelotte MB, Schumacher BL, Kuettner KE, Gitelis SH, Thonar EJ. Synthesis and turnover of proteoglycans by human and bovine adult articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Matrix* 1992;12:116-29.
- [44] Hedbom E, Antonsson P, Hjerpe A, Aeschlimann D, Paulsson M, Rosa-Pimentel E, Sommarin Y, Wendel M, Oldberg A, Heinegard D. Cartilage matrix proteins. An acidic oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage. *J Biol Chem* 1992;267:6132-6.
- [45] Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996;6:986-94.
- [46] Hink J, Jansen E. Are superoxide and/or hydrogen peroxide responsible for some of the beneficial effects of hyperbaric oxygen therapy? *Med Hypotheses* 2001;57:764-9.
- [47] Hipp R, Frey G, Mielke L, Breinbauer B, Kling M, Hargasser S. [Technical prerequisites, required personnel and practical implementation of hyperbaric oxygenation]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 1996;31:108-10.
- [48] Honda S, Matsuo M. The sensitivity to hyperbaric oxygen of human diploid fibroblasts during ageing in vitro. *Mech Ageing Dev* 1980;12:31-7.
- [49] Huang KC, Hsu WH, Peng KT, Huang TJ, Hsu RW. Hyperbaric oxygen therapy in orthopedic conditions: an evaluation of safety. *J Trauma* 2006;61:913-7.
- [50] Huber A, Bai P, de Murcia JM, de MG. PARP-1, PARP-2 and ATM in the DNA damage response: functional synergy in mouse development. *DNA Repair (Amst)* 2004;3:1103-8.
- [51] Huch K, Stove J, Puhl W, Gunther KP. [Review and comparison of culture-techniques for articular chondrocytes]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 2002;140:145-52.
- [52] Hunter W. Of the structure and disease of articulating cartilages. 1743. *Clin Orthop Relat Res* 1995:3-6.
- [53] Hunziker EB. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10:432-63.
- [54] Imhoff AB, Ottl GM, Burkart A, Traub S. [Autologous osteochondral transplantation on various joints]. *Orthopade* 1999;28:33-44.
- [55] Insall J. The Pridie debridement operation for osteoarthritis of the knee. *Clin Orthop Relat Res* 1974:61-7.
- [56] Jager M, Bittersohl B, Zilkens C, Herten M, Krauspe R. [Regeneration of osteochondral defects in the knee]. *Z Orthop Unfall* 2011;149:37-44.

-
- [57] Juettner B, Jaeger K. Hyperbare Oxygenierung. In: Kochs E, Adams H A, Spies C, editors; 2008; p. 1218-23.
- [58] Kang TS, Gorti GK, Quan SY, Ho M, Koch RJ. Effect of hyperbaric oxygen on the growth factor profile of fibroblasts. *Arch Facial Plast Surg* 2004;6:31-5.
- [59] Khan M, Meduru S, Mohan IK, Kuppusamy ML, Wisel S, Kulkarni A, Rivera BK, Hamlin RL, Kuppusamy P. Hyperbaric oxygenation enhances transplanted cell graft and functional recovery in the infarct heart. *J Mol Cell Cardiol* 2009;47:275-87.
- [60] Kunnavatana SS, Quan SY, Koch RJ. Combined effect of hyperbaric oxygen and N-acetylcysteine on fibroblast proliferation. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;131:809-14.
- [61] Lee JW, Kim YH, Kim SH, Han SH, Hahn SB. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and its clinical applications. *Yonsei Med J* 2004;45 Suppl:41-7.
- [62] Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng* 1998;4:415-28.
- [63] Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng* 1998;4:415-28.
- [64] Malda J, Martens DE, Tramper J, van Blitterswijk CA, Riesle J. Cartilage tissue engineering: controversy in the effect of oxygen. *Crit Rev Biotechnol* 2003;23:175-94.
- [65] Marshall NJ, Goodwin CJ, Holt SJ. A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. *Growth Regul* 1995;5:69-84.
- [66] Mayer-Wagner S, Schiergens TS, Sievers B, Redeker JI, Schmitt B, Buettner A, Jansson V, Muller PE. Scaffold-free 3D cellulose acetate membrane-based cultures form large cartilaginous constructs. *J Tissue Eng Regen Med* 2011;5:151-5.
- [67] Mielke L, Breinbauer B, Kling M, Eisler K, Moon RE, Hipp R. [Indications for primary or initial use of hyperbaric oxygenation]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 1996;31:100-2.
- [68] Milovanova TN, Bhopale VM, Sorokina EM, Moore JS, Hunt TK, Hauer-Jensen M, Velazquez OC, Thom SR. Hyperbaric oxygen stimulates vasculogenic stem cell growth and differentiation in vivo. *J Appl Physiol* 2009;106:711-28.
- [69] Moon RE, Mielke L, Breinbauer B, Entholzner E, Hargasser S, Hipp R. [Hyperbaric oxygenation: therapy with oxygen using hyperbaric

- pressure]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 1996;31:97-9.
- [70] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
- [71] Muller B, Kohn D. [Indication for and performance of articular cartilage drilling using the Pridie method]. *Orthopade* 1999;28:4-10.
- [72] Nebelung S, Ladenburger A, Gavenis K, Stoffel M, Andereya S, Muller-Rath R. [Tissue engineering of cartilage replacement material - mechanical stimulation in the in-vitro cultivation of human chondrocytes]. *Z Orthop Unfall* 2011;149:52-60.
- [73] Nehrer, S. Knorpelschäden im Knie- Diagnose, Therapie und Sportberatung. <http://www.sinwel.com/gots/otpstick2010/page/nehner01.html> . 2012.
Ref Type: Electronic Citation
- [74] Niemeyer P, Mehlhorn A, Jaeger M, Kasten P, Simank HG, Krause U, Sudkamp NP. [Adult mesenchymal stem cells for the regeneration of musculoskeletal tissue]. *MMW Fortschr Med* 2004;146:45.
- [75] Niethard M, Schneider U, Wallich R. [Differential behaviour of human adult arthrotic chondrocytes under 2D- and 3D-cultivation set-ups in a collagen I gel]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 2007;145:102-7.
- [76] Oczenski W. *Atmen - Atemhilfen*. 2012.
- [77] Park SM, Peter ME. microRNAs and death receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008;19:303-11.
- [78] Pfander D, Gelse K. Hypoxia and osteoarthritis: how chondrocytes survive hypoxic environments. *Curr Opin Rheumatol* 2007;19:457-62.
- [79] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-7.
- [80] Plafki C, Peters P, Almeling M, Welslau W, Busch R. Complications and side effects of hyperbaric oxygen therapy. *Aviat Space Environ Med* 2000;71:119-24.
- [81] Poole CA. Articular cartilage chondrons: form, function and failure. *J Anat* 1997;191 (Pt 1):1-13.
- [82] Roberts GP, Harding KG. Stimulation of glycosaminoglycan synthesis in cultured fibroblasts by hyperbaric oxygen. *Br J Dermatol* 1994;131:630-3.

- [83] Roche Applied Science. Apoptosis, Cell Death and Cell Proliferation. Rode H J, Eisel D, and Frost I. 3rd Edition. 2012.
Ref Type: Pamphlet
- [84] Rothfuss A, Merk O, Radermacher P, Speit G. Evaluation of mutagenic effects of hyperbaric oxygen (HBO) in vitro. II. Induction of oxidative DNA damage and mutations in the mouse lymphoma assay. *Mutat Res* 2000;471:87-94.
- [85] Rothfuss A, Stahl W, Radermacher P, Speit G. Evaluation of mutagenic effects of hyperbaric oxygen (HBO) in vitro. *Environ Mol Mutagen* 1999;34:291-6.
- [86] Schulze M, Kuettner KE, Cole AA. [Adult human chondrocytes in alginate culture. Preservation of the phenotype for further use in transplantation models]. *Orthopade* 2000;29:100-6.
- [87] Seo S, Na K. Mesenchymal stem cell-based tissue engineering for chondrogenesis. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:806891.
- [88] Shakibaei M, Csaki C, Rahmanzadeh M, Putz R. [Interaction between human chondrocytes and extracellular matrix in vitro: a contribution to autologous chondrocyte transplantation]. *Orthopade* 2008;37:440-7.
- [89] Shakibaei M, John T, De SP, Rahmanzadeh R, Merker HJ. Signal transduction by beta1 integrin receptors in human chondrocytes in vitro: collaboration with the insulin-like growth factor-I receptor. *Biochem J* 1999;342 Pt 3:615-23.
- [90] Speit G, Dennog C, Lampl L. Biological significance of DNA damage induced by hyperbaric oxygen. *Mutagenesis* 1998;13:85-7.
- [91] Speit G, Dennog C, Radermacher P, Rothfuss A. Genotoxicity of hyperbaric oxygen. *Mutat Res* 2002;512:111-9.
- [92] Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK, Rodrigo JJ. [The microfracture technic in the management of complete cartilage defects in the knee joint]. *Orthopade* 1999;28:26-32.
- [93] Thom SR. Oxidative stress is fundamental to hyperbaric oxygen therapy. *J Appl Physiol* 2009;106:988-95.
- [94] Thom SR. Hyperbaric oxygen: its mechanisms and efficacy. *Plast Reconstr Surg* 2011;127 Suppl 1:131S-41S.
- [95] Thom SR, Bhopale VM, Velazquez OC, Goldstein LJ, Thom LH, Buerk DG. Stem cell mobilization by hyperbaric oxygen. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290:H1378-H1386.
- [96] Thom SR, Milovanova TN, Yang M, Bhopale VM, Sorokina EM, Uzun G, Malay DS, Troiano MA, Hardy KR, Lambert DS, Logue CJ, Margolis DJ. Vasculogenic stem cell mobilization and wound recruitment in diabetic patients: increased cell number and intracellular regulatory protein

- content associated with hyperbaric oxygen therapy. *Wound Repair Regen* 2011;19:149-61.
- [97] Tompach PC, Lew D, Stoll JL. Cell response to hyperbaric oxygen treatment. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1997;26:82-6.
- [98] Urban JP. The chondrocyte: a cell under pressure. *Br J Rheumatol* 1994;33:901-8.
- [99] Vanderploeg EJ, Wilson CG, Levenston ME. Articular chondrocytes derived from distinct tissue zones differentially respond to in vitro oscillatory tensile loading. *Osteoarthritis Cartilage* 2008;16:1228-36.
- [100] VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques* 2008;44:619-26.
- [101] Weber SU, Koch A, Kankleit J, Schewe JC, Siekmann U, Stuber F, Hoeft A, Schroder S. Hyperbaric oxygen induces apoptosis via a mitochondrial mechanism. *Apoptosis* 2009;14:97-107.
- [102] Wernike E, Li Z, Alini M, Grad S. Effect of reduced oxygen tension and long-term mechanical stimulation on chondrocyte-polymer constructs. *Cell Tissue Res* 2008;331:473-83.
- [103] Wiese S, Beckers S, Siekmann U, Baltus T, Rossaint R, Schroder S. [Hyperbaric oxygenation: characteristics of intensive care and emergency therapy]. *Anaesthesist* 2006;55:693-705.
- [104] Wilson, W., van, Donkelaar C., Buma, P., van, Rietbergen B., and Huiskes, R. The cause and nature of collagen damage after mechanical overloading. 2005.
Ref Type: Pamphlet
- [105] Woodhouse BC, Dianov GL. Poly ADP-ribose polymerase-1: an international molecule of mystery. *DNA Repair (Amst)* 2008;7:1077-86.
- [106] Wu JP, Kirk TB, Zheng MH. Study of the collagen structure in the superficial zone and physiological state of articular cartilage using a 3D confocal imaging technique. *J Orthop Surg Res* 2008;3:29.
- [107] Xiao Y, Mareddy S, Crawford R. Clonal characterization of bone marrow derived stem cells and their application for bone regeneration. *Int J Oral Sci* 2010;2:127-35.
- [108] Ysart GE, Mason RM. Responses of articular cartilage explant cultures to different oxygen tensions. *Biochim Biophys Acta* 1994;1221:15-20.
- [109] Yuan LJ, Niu CC, Lin SS, Chan YS, Yang CY, Chen WJ, Ueng SW. Additive effects of hyperbaric oxygen and platelet-derived growth factor-BB in chondrocyte transplantation via up-regulation expression of platelet-derived growth factor-beta receptor. *J Orthop Res* 2009;27:1439-46.

-
- [110] Yuan LJ, Ueng SW, Lin SS, Yeh WL, Yang CY, Lin PY. Attenuation of apoptosis and enhancement of proteoglycan synthesis in rabbit cartilage defects by hyperbaric oxygen treatment are related to the suppression of nitric oxide production. *J Orthop Res* 2004;22:1126-34.

8. Abbildungsverzeichnis

- **Abb. 1:** Einfluss unterschiedlich hoher alveolärer Sauerstoff-Partialdrücke auf den arteriellen Sauerstoffpartialdruck bzw. Sauerstoffgehalt und das Verhalten venösen Sauerstoffpartialdrucks in Abhängigkeit von der arteriovenösen Sauerstoffdifferenz C(a-v)O₂ (nach Bock et al. 1994)9
- **Abb. 2:** Mehrpersonendruckkammer, HBO-Zentrum München (www.hbozentrum.de).....10
- **Abb. 3:** Beispiele für typische Behandlungsschemata (aus: Wiese S, Hyperbare Sauerstofftherapie).....11
- **Abb. 4:** Indikationen zur Hyperbaren Oxygenierung nach UHMS (aus: Wiese S, Hyperbare Sauerstofftherapie).....12
- **Abb. 5:** Histologischer Aufbau von Knorpelgewebe (aus: Nehrer S: Knorpelschäden am Knie).....20
- **Abb. 6:** Arkadenstruktur der Kollagenfasern des hyalinen Gelenkknorpels nach BENNINGHOFF (aus: Wilson W: the cause and nature of collagen damage after mechanical overloading).....20
- **Abb. 7:** HAUX TESTCOM 200/2.....30
- **Abb. 8:** Standardversuchsbedingungen TS 300/9032
- **Abb. 9:** WST-1 Proliferationsreagenz und sein Reaktionsprodukt Formazan...34
- **Abb. 10:** Humane Chondrozyten (aus Patientengewebe isoliert) in Monolayerkultur47
- **Abb. 11:** Humane Chondrozyten (industriell bezogen) in Monolayerkultur.....48
- **Abb. 12:** Humane Fibroblasten in Monolayerkultur.....48
- **Abb. 13:** Standardkurve zur Ermittlung der absoluten Zellzahl für humane Fibroblasten und Chondrozyten.....50
- **Abb. 14:** Proliferation humaner Fibroblasten nach 7-tägiger HBO Behandlung TS 300/90 im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe.....51
- **Abb. 15:** Einfluss der Druckhöhe auf die Proliferation humaner Fibroblasten TS 300/90 vs. TS 200/90.....52

- **Abb. 16:** Einfluss der Behandlungsdauer auf die Proliferation humaner Fibroblasten TS 300/60 vs. TS 300/90 vs. TS 300/120.....53
- **Abb. 17:** Proliferation humaner Chondrozyten nach 7-tägiger HBO Behandlung TS 300/90 im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe.....54
- **Abb. 18:** Einfluss der Druckhöhe auf die Proliferation humaner Chondrozyten TS 200/90 vs. TS 300/90 vs. Kontrollgruppe.....55
- **Abb. 19:** Einfluss der Behandlungsdauer auf die Proliferation humaner Chondrozyten TS 300/60 vs. TS 300/90 vs. TS 300/120.....56
- **Abb. 20:** Unterschiede in der Kollagenexpression humaner Chondrozyten vor Versuchsbeginn.....58
- **Abb. 21:** Genexpression von Kollagen Typ II im Verlauf der 7-tägigen HBO Behandlung TS 300/90 verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe.....59
- **Abb. 22:** Einfluss der Druckhöhe auf die Genexpression von Kollagen Typ II TS 200/90 vs. TS 300/90.....60
- **Abb. 23:** Einfluss der Behandlungsdauer auf die Expression von Kollagen Typ II TS 300/60 vs. TS 300/90 vs. TS 300/120.....61
- **Abb. 24:** Genexpression von COMP im Verlauf der 7-tägigen HBO Behandlung TS 300/90.....62
- **Abb. 25:** Einfluss der Druckhöhe auf die Genexpression von COMP; TS 200/90 vs. TS 300/90.....63
- **Abb. 26:** Einfluss der Behandlungsdauer auf die Genexpression von COMP, TS 300/60 vs. TS 300/90 vs. TS 300/120.....64
- **Abb. 27:** Genexpression von Kollagen Typ I nach 7-tägiger HBO Behandlung TS 300/90.....65
- **Abb. 28:** Einfluss des applizierten Überdrucks auf die Genexpression von Kollagen Typ I; TS 200/90 vs. TS 300/90.....66
- **Abb. 29:** Einfluss der Behandlungsdauer auf die Genexpression von Kollagen Typ I, TS 300/60 vs. TS 300/90 vs. TS 300/120.....67
- **Abb. 30:** Genexpression von Caspase 3 nach 7-tägiger HBO Behandlung mit TS 300/90.....68
- **Abb. 31:** Einfluss des applizierten Überdrucks auf die Genexpression von Caspase 3; TS 200/90 vs. TS 300/90.....69
- **Abb. 32:** Einfluss der Behandlungsdauer auf die Genexpression von Caspase 3; TS 300/60 vs. TS 300/90 vs. TS 300/120.....70

-
- **Abb. 33:** Genexpression von Poly-ADP-Ribose-Polymerase 1 (PARP) nach 7-tägiger HBO Behandlung TS 300/90.....71
 - **Abb. 34:** Einfluss des applizierten Überdrucks auf die Genexpression von Poly-ADP-Ribose-Polymerase 1; TS 200/90 vs. TS 300/90.....72
 - **Abb. 35:** Einfluss der Behandlungsdauer auf die Genexpression von Poly-ADP-Ribose-Polymerase 1; TS 300/60 vs. TS 300/90 vs. TS 300/120.....73

9. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--|
| °C | Grad Celsius |
| µl | Microliter |
| µm | Micrometer |
| Abb. | Abbildung |
| ACT | Autologe Chondrozytentransplantation |
| ARDS | Acute respiratory distress syndrome |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| bzw. | beziehungsweise |
| ca. | circa |
| CASP3 | Caspase 3 |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| COMP | Cartilage Oligomeric Matrix Protein |
| d.h. | das heißt |
| dl | Deziliter |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNS/DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DTT | 1,4 Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| etc. | et cetera |
| FCS | Fetal calf serum |
| g | Gramm |
| GTÜM | Gesellschaft für Tauch- und Überdruckmedizin |
| H ₂ O | Wasser |
| HBO | Hyperbare Oxygenierung |
| HIV | Human immunodeficiency virus |
| hPa | Hectopascal |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| MPa | Megapascal |

| | |
|-----------------|---|
| mRNA | Messenger Ribonucleinsäure |
| MSC | Mesenchymale Stammzelle(n) |
| O ₂ | Sauerstoff |
| OATS | Osteochondral autologous transplatation |
| OD | Optische Dichte |
| OP | Operation(ssaal) |
| PARP-1 | Poly (ADP) Ribose Polymerase |
| PBS | Phospahtgepufferte Salzlösung |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| pO ₂ | Sauerstoffpartialdruck |
| RER | Raues endoplasmatisches Retikulum |
| RNA | Ribunukleinsäure, ribonucleid acid |
| ROS | Reactive oxygen species |
| TGFβ | Transforming growth factor β |
| TS | Therapieschema |
| UHMS | Undersea and hyperbaric medical society |
| USA | Vereinigte Staaten von Amerika |
| v.a. | vor allem |
| vgl. | vergleiche |
| z.B. | Zum Beispiel |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

10. Danksagung

Mein herzlicher Dank für die Überlassung dieses spannenden Themas und für die stets ausgezeichnete Zusammenarbeit gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Peter E. Müller, Orthopädische Klinik und Poliklinik der Ludwig- Maximilians-Universität.

Für die vorbildliche Betreuung meiner Arbeit, das viele konstruktive Feedback und die liebe Unterstützung danke ich vor allem Frau Dr. med. Carolin Melcher.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Frank E. Düren für die gute Einführung in das Thema, sowie bei Frau Birte Sievers bedanken. Sie hat mir in vielen theoretischen und praktischen Fragen mit Rat und Tat zur Seite gestanden und maßgeblich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen.

Zwei weiteren Damen aus dem Labor für Biomechanik, Frau Bärbel Schmitt und Frau Julia Redeker möchte ich ein herzliches Dankeschön für Ihre Hilfe und Geduld mit mir beim Erlernen der Methodik aussprechen. Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Lars Schliak für die freundliche Unterstützung bei allen EDV-Fragen.

Auch meinen Kommilitonen und Mitdoktoranden, vor allem Herrn Dr. med. Tobias Schiergens möchte ich für Ihre Hilfe, den regen Gedanken- und Erfahrungsaustausch, die vielen guten Ratschläge und praktischen Tips danken. Ein herzliches Vergelt's Gott auch an das HBO Zentrum München, besonders an Herrn Dr. med. Dipl. Ing. Andreas Müller für die freundliche Überlassung der Druckkammer, ohne die die Versuche meiner Arbeit nicht durchführbar gewesen wären.

Nicht zuletzt danken möchte ich meinem Freund Peter, meiner Familie und meinen Freundinnen für ihre unermessliche Geduld mit mir, die Ermutigung zur rechten Zeit, dafür dass sie immer ein offenes Ohr für meine Sorgen hatten und Verständnis wenn die Zeit zum Treffen der Arbeit im Labor weichen musste.